



VNIVERSITAT<sup>IS</sup> VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**EXPRESIÓN DE microRNAs EN LAS ZONAS DE TRANSICIÓN EPITELIO  
MESENQUIMAL EN EL CARCINOMA COLORECTAL COMO FACTOR  
INMUNOMODULADOR Y PRONÓSTICO. ESTUDIO CLÍNICO PATOLÓGICO**

**TESIS DOCTORAL**

Memoria que, para aspirar al grado de doctor por la Universitat de València  
presenta:

**María Carolina Martínez Ciarpaglini**

Directores:

**Prof. Andrés Cervantes**

**Prof. Samuel Navarro**

**Prof. Antonio Ferrández**

**2018**



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Programa de doctorado 3139: Medicina digestiva.

D. Andrés Cervantes, Profesor del Departamento de Medicina de la Universitat de Valencia.

D. Samuel Navarro, Profesor del Departamento de Patología de la Universitat de Valencia.

D. Antonio Ferrández, Profesor del Departamento de Patología de la Universitat de Valencia.

CERTIFICAN que María Carolina Martínez Ciarpaglini, Licenciada en Medicina por la Universidad Central de Venezuela, ha realizado, bajo nuestra dirección el trabajo que lleva por título:

*Expresión de microRNAs en las zonas de transición epitelio mesenquimal en el carcinoma colorectal como factor inmunomodulador y pronóstico. Estudio clínico patológico.*

*Él cual consideramos satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Medicina de la Universitat de Valencia.*

*Y para que así conste, expedimos este certificado en Valencia, Septiembre de 2018.*

Andrés Cervantes

Samuel Navarro

Antonio Ferrández

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia:

mis hijos Sarquis y Santiago, mis luces en el camino y mis mayores motivos, mi marido, por ser mi equipo perfecto, mi apoyo y mi mayor admirador, gracias por impulsarme a sobrepasar mis límites, mi madre, por todo el sacrificio y el infinito amor.

A mis directores:

Andrés por su enorme generosidad, por brindarme una oportunidad única y por confiar en mí aun sin motivos,  
Samuel por hacer que lo difícil parezca muy fácil, por aligerar la carga del día a día con su positividad y su humildad,  
Antonio, mi mentor, mi maestro y mi amigo, por enseñarme a amar esta especialidad y a creer en mí.

A mi “tutor en la sobra” Francisco, por enseñarme a ver los “grises” con el conocimiento, las horas de apoyo y paciencia.

A Carlos Monteagudo por transmitirme la ilusión hacia la investigación.  
A mi compi Mariángeles Sales por la compañía, su cordura y su buen humor.

A todas las personas que colaboraron en la elaboración de este trabajo desde la recolección del material, hasta la realización de las técnicas y su interpretación: Sara, Fani, Cristina, Elisa, Esther, Rubén, Bruno, Amparito, Pepe, Gema, Jose y Bea, sin vuestra ayuda habría sido imposible.

A mis amigos que se han convertido en familia, que se han embarcado en este proyecto de vida con nosotros y que siempre están para animar, compartir, reír y llorar: Aime, César, Monica, Fernando, Rosa, Carmen, Zurlay y Nelson.

*A mis hijos Sarquis y Santiago...*

# **INDICE**

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
1.1	Introducción .....	9
1.2	Situación actual del cáncer colorectal .....	10
1.3	Desdiferenciación tumoral focal (DTF) .....	12
1.3.1	Criterios para la valoración de la DTF .....	14
1.4	Transición epitelio-mesenquimal (TEM) .....	18
1.5	Mecanismos moleculares reguladores del proceso de TEM .....	20
1.5.1	<i>ZEB</i> (zinc finger E-box-binding homeobox) .....	20
1.6	microRNAs .....	21
1.6.1	La familia miR200 .....	23
1.7	Evasión de la respuesta inmune en las zonas de DTF .....	25
1.8	La vía de retroalimentación miR200- <i>TGF-β</i> - <i>ZEB</i> en la regulación del proceso de TEM y su relación con la expresión de <i>PD-L1</i> .....	26
<b>II.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
2.1	Hipótesis .....	28
2.2	Objetivo general .....	28
2.3	Objetivos específicos .....	28
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1	Muestra a estudio .....	30
3.1.1	Criterios de exclusión.....	30
3.2	Estudio inmunohistoquímico .....	30
3.3	Valoración de la DTF .....	31
3.4	Valoración de la expresión de proteínas de la vía reparadora de DNA .....	35
3.5	Extracción del material genético.....	36

3.6	Transcripción reversa (RT-PCR) .....	37
3.6.1	Estudio de miRNAs .....	37
3.6.2	Estudio de expresión de <i>ZEB1</i> , <i>ZEB2</i> y <i>PD-L1</i> .....	39
3.7	PCR cuantitativa .....	41
3.8	Análisis estadístico.....	42
3.8.1	Análisis descriptivo y de asociación .....	42
3.8.2	Análisis de supervivencia .....	43
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
4.1	Características clinicopatológicas generales .....	45
4.2	Características clinicopatológicas de acuerdo al estadio clínico .....	45
4.3	Expresión de miR200, <i>ZEB</i> y <i>PD-L1</i> en el frente invasor vs el centro del tumor .....	48
4.3.1	Correlación entre la expresión de <i>PD-L1</i> y la expresión de miR200 y <i>ZEB</i> en el frente invasor y en el centro tumoral.....	50
4.4	Hallazgos en función del patrón de invasión .....	52
4.5	Desdiferenciación tumoral focal .....	55
4.5.1	Expresión de miRNAs y mRNAs de acuerdo al grado de DTF .60	
4.6	Índice mitótico y apoptótico y presencia de emperipolesis en las zonas de DTF .....	63
4.7	Análisis de acuerdo al grado de diferenciación histológico.....	67
4.8	Análisis de supervivencia .....	68
4.8.1	Análisis de supervivencia en estadios II .....	71
4.8.2	Análisis de supervivencia en estadios III.....	73
4.8.3	Análisis de supervivencia en estadios I, II y III.....	76
4.8.4	Análisis de supervivencia en estadios IV.....	82
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>85</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>92</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>94</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>104</b>

## **IX. ABREVIATURAS.**

**CCR:** cáncer colorectal.

**DTF:** desdiferenciación tumoral focal o *tumor budding*.

**TEM:** transición epitelio-mesenquimal.

**LV:** linfovascular.

**HE:** hematoxilina-eosina.

**CKAE1/AE3:** Citoqueratina AE1/AE3.

**PDC:** *poorly differentiated clusters* o grupos pobremente diferenciados.

**ITBCC:** *International Tumor Budding Consensus Conference*.

**TME:** transición mesenquimal-epitelial.

**ROC:** *receiver operating characteristic*.

**TCF:** factores de transcripción de la familia *T cell factor*.

**CAF:** complejos de adhesión focal.

**MMPs:** metaloproteinasas.

**TGF- $\beta$ :** *transforming growth factor receptor- $\beta$* .

**HGF:** *hepatocyte growth factor*.

**EGF:** *epidermal growth factor*.

**PDGF:** *placental-derived growth factor*.

**ZEB:** *zinc finger E-box-binding homeobox 1*.

**HLH:** *helix-loop-helix family factors*.

**WNT:** *wingless signaling pathway*.

**SMAD2/3:** *mothers against decapentaplegic homologs 2 and 3*.

**SIP1:** *SMAD interacting protein 1*, mejor conocido como *ZEB1*.

**ZO-3:** zónula occludens-3.

**RISC:** *RNA-induced silencing complex*.

**3' UTR:** *untranslated región.*

**miRNA:** micro RNA.

**mRNA:** *messenger RNA* o RNA mensajero.

**RT-PCR:** transcripción reversa.

**PCR:** *polymerase chain reaction* o reacción en cadena de polimerasa.

**CGA:** campo de gran aumento.

**ICPB:** *immune check-point blockade* o puntos de bloqueo de la respuesta inmune.

**CTLA4:** *T-lymphocyte-associated protein-4.*

**PD-1:** *programmed death-1.*

**PD-L1:** *programmed death ligand-1* (CD279 o PDCD1).

**APC:** *antigen-presenting cell* o células presentadoras de antígenos.

**IFN $\gamma$ :** interferon- $\gamma$ .

**NK:** *natural killer.*

**FDA:** US Food and Drug Administration.

**MMR:** *mismatch repair.*

**IMS:** inestabilidad de microsatélites.

**IMS-H:** alto nivel de inestabilidad de microsatélites.

**cDNA:** DNA complementario.

**Log-rank:** prueba del logaritmo del rango.

**HR:** Hazard ratio.

**STE:** supervivencia tumoral específica.

**SLE:** supervivencia libre de enfermedad.

**MSS:** *microsatellite stable.*

## I. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1- Introducción

El subtipo mesenquimal (CMS4) de la reciente clasificación molecular de consenso del cáncer colorectal (CCR) constituye el grupo de tumores de peor pronóstico, caracterizados por la expresión de genes reguladores del proceso de transición epitelio-mesenquimal (TEM) y por la activación mantenida de la vía TGF- $\beta$  (*transforming growth factor receptor- $\beta$* ).<sup>1</sup> La desdiferenciación tumoral focal (DTF) o “*tumor budding*”, se refiere a la presencia de células tumorales aisladas o en pequeños grupos de menos de 5 células que se desprenden del frente invasor tumoral, y se asocian a un mayor riesgo de recurrencia y a una peor supervivencia.<sup>2-4</sup> Se considera que el proceso fisiopatológico que explica la presencia de estas células en el frente invasor es la TEM, ejecutada por células con una sobreexpresión de genes relacionados con este proceso, incluyendo a TGF- $\beta$ .<sup>5-8</sup> Los microRNAs (miRNAs) son pequeños fragmentos de RNA que regulan la expresión de genes al inhibir la transcripción de sus mRNAs (*messenger RNA*).<sup>9</sup> En el proceso de TEM, la familia miR200, se ha descrito como uno de los principales reguladores implicados en el control de la expresión de genes importantes como son *ZEB1* y *ZEB2*.<sup>10-12</sup> En algunos modelos tumorales, miR200 se ha relacionado también con la regulación de la respuesta inmune a través del control de la expresión de *PD-L1* (*programmed death ligand-1*).<sup>13</sup> Pero, ¿hasta qué punto contribuye la DTF en el fenotipo molecular del tumor? Considerando que tanto los tumores CSM4 como las zonas del frente invasor con DTF tienen en común la activación del proceso de TEM, resulta

interesante indagar en este sentido y averiguar cómo influye el frente invasor en el estudio del fenotipo molecular del CCR. El objetivo de este estudio es, por lo tanto, valorar la influencia de la zona tumoral evaluada (frente invasor vs centro tumoral), el patrón de invasión y la presencia de DTF en la expresión de moléculas implicadas en la regulación del proceso de TEM: miR200 y *ZEB*, y evaluar la influencia de estos factores en la evasión de la respuesta inmune mediada por la expresión de *PD-L1*. Por otro lado, estudiaremos tres métodos diferentes para la valoración de la DTF y averiguaremos como se correlacionan con la supervivencia y con la expresión de estos miRNAs y mRNAs en función de la zona tumoral evaluada.

## **1.2.- Situación actual de cáncer colorectal**

El CCR es uno de los tumores malignos más frecuentes en el ser humano. Solo en el año 2015 se diagnosticaron 1,7 millones de casos en todo el mundo, lo que representa un 8% de todos los casos de cáncer de nuevo diagnóstico durante dicho período.<sup>14</sup> Esta enfermedad ocupa el 3er lugar en orden de incidencia en ambos sexos, precedido únicamente por el cáncer de próstata y de pulmón en los hombres, y por el cáncer de mama y de pulmón en las mujeres.<sup>15</sup> Se estima que en el año 2015 murieron unas 832.000 personas por CCR en el mundo, lo que sitúa a esta enfermedad como la segunda causa de muerte por cáncer a nivel global.<sup>14</sup> El CCR es más frecuente en hombres que en mujeres y, de hecho, antes de los 79 años de edad, aproximadamente 1 de cada 28 hombres desarrollará la enfermedad, mientras que en las mujeres la proporción se reduce a 1 de cada 43.<sup>14</sup> En Europa, la situación es similar a

la descrita a nivel mundial, donde con unos 372.000 casos diagnosticados solo en el año 2012, el CCR representa la segunda causa de muerte por cáncer después del cáncer de pulmón.<sup>16</sup>

En la última década, la implantación sistemática de programas de cribado en la mayor parte de los países de la Unión Europea, ha permitido el diagnóstico temprano y el tratamiento precoz del CCR, aunque cerca de 20 a 25% de los casos diagnosticados presentan enfermedad metastásica durante el curso de su evolución clínica.<sup>17,18</sup>

El estadiaje del CCR de acuerdo al sistema TNM: grado de infiltración tumoral (T), invasión nodal (N) y metástasis a distancia (M), es actualmente el mayor predictor de supervivencia y uno de los parámetros más útiles para el manejo clínico del paciente.<sup>19</sup> Otros factores histopatológicos como el grado de diferenciación histológica y la presencia de invasión linfovascular (LV) y perineural también han demostrado influir de forma significativa en el pronóstico de la enfermedad.<sup>17,20,21</sup> Sin embargo, aún existe una gran necesidad de mejorar la estratificación de riesgo en los estadios iniciales donde el beneficio de la quimioterapia neoadyuvante no está del todo claro y podría ser determinante en algunos casos.

### **1.3.- Desdiferenciación tumoral focal**

El concepto de DTF o “*tumor budding*”, se refiere a la presencia de células tumorales aisladas o en pequeños grupos de menos de 5 células que se desprenden del frente invasor tumoral y se extienden al estroma adyacente.<sup>22</sup> Este fenómeno es considerado como la manifestación histopatológica del proceso de TEM, un proceso dinámico mediante el cual, las células pierden el fenotipo epitelial y adquieren la capacidad migratoria e invasiva, propia de las células mesenquimales.<sup>8,23–25</sup> La presencia de DTF se asocia a un mayor riesgo de recurrencia locoregional y a distancia, y, por lo tanto, a una reducción de la supervivencia tumoral específica en pacientes con CCR.<sup>3,25–33</sup> Las lesiones con un alto grado de DTF se asocian a un mayor estadio pTNM, a una menor diferenciación tumoral, y a la presencia de invasión LV, perineural y ganglionar.<sup>3,26,31,34–38</sup> La utilidad clínica de la valoración del grado de DTF ha sido ampliamente demostrada en la literatura, y se reconoce como un factor predictivo independiente de la presencia de metástasis ganglionar en el CCR precoz (pT1) y como un factor pronóstico adverso en pacientes con CCR en estadio II.<sup>2,20,36,38</sup> Por lo tanto, la DTF proporciona información útil en los siguientes escenarios clínicos:

- Como biomarcador pronóstico para seleccionar pacientes en estadio II, en los que un alto grado de DTF se asocia con un mayor riesgo de recurrencia, por lo que estos pacientes podrían beneficiarse de la terapia adyuvante.<sup>31,33,38,39</sup>

- Como factor predictivo de la presencia de afectación ganglionar en el CCR precoz (pT1), especialmente en las muestras de polipectomía donde se ha demostrado que la presencia de un alto grado de DTF se asocia con un riesgo de aproximadamente 20% de invasión ganglionar.<sup>20,36,40-42</sup>
- En el CCR estadio III, la DTF parece mejorar la estratificación de riesgo ofrecida por el sistema pTNM, aunque son pocos los estudios que evalúan específicamente este grupo de pacientes.<sup>43,44</sup>

Las primeras referencias sobre el análisis de la influencia del frente invasor neoplásico en el comportamiento de la enfermedad datan del año 1960, cuando Imai y col, analizan el aspecto del frente invasor de casos de carcinoma gástrico y señalan la presencia del patrón “cirrótico” con células sueltas como un indicador de agresividad.<sup>45</sup> Sin embargo, no es sino hasta la década de los 80’s cuando autores como Gabbert y col, y Carr y col, realizan un estudio morfológico exhaustivo del frente invasor tumoral.<sup>46,47</sup> En ambas publicaciones los autores describen la presencia de disociación y pérdida de las características citoarquitecturales normales de las células neoplásicas epiteliales, infiltrando el tejido sano mediante la adquisición de motricidad, fenómeno que asociaron a un incremento en la capacidad invasiva del tumor. Cuatro años después, Morodomi y col. emplean por primera vez el término “*tumoral budding*” (o “gemación tumoral”), más popular actualmente en la literatura inglesa, pues estas células sueltas parecían desprenderse o “brotar” (*budd*) de las glándulas neoplásicas en el frente invasor. Los autores encuentran una relación significativa entre la presencia de DTF, invasión

neoplásica LV e invasión ganglionar. Basados en estos hallazgos y en la localización en el frente invasor tanto de la invasión LV como de la DTF, los autores sugieren que la DTF podría reflejar un estadio de desdiferenciación en el que las células neoplásicas eran capaces de invadir la pared de los vasos sanguíneos, favoreciendo la potencial utilidad de este parámetro para predecir infiltración ganglionar.<sup>34</sup>

### **1.3.1- Criterios para la valoración de la desdiferenciación tumoral focal**

Durante las últimas tres décadas, se han realizado grandes esfuerzos por construir un sistema de gradación objetivo y reproducible que permita la implantación de la valoración de la DTF en los informes patológicos de rutina. Hemos encontrado grandes diferencias en cuanto a los criterios utilizados en la literatura para la valoración de este parámetro en cuanto a: selección de la sección(es) más representativa para realizar el estudio, número de campos a evaluar, tamaño del objetivo a utilizar, recuento en HE vs inmunotinción para CKAE1/AE3 y sistema de gradación y/o puntos de corte para la estratificación del riesgo (Tabla 1). Algunos autores prefieren el recuento de grupos de células pobremente diferenciadas o PDC (*poorly differentiated clusters*), un concepto que incluye grupos de más de 5 células que se desprenden del frente invasor tumoral y que aparentemente podrían representar un estado previo a la DTF.<sup>42,44,48,49</sup>

En el año 2016, se emite por primera vez una guía de consenso para la valoración de la DTF, en el denominado ITBCC (*International Tumor Budding Consensus Conference*). En esta guía se sugiere la inclusión sistemática de la DTF en los protocolos para la elaboración de informes

patológicos de rutina de las piezas de colectomía por adenocarcinoma.<sup>2</sup> También se recomienda con un nivel de evidencia moderado, que el recuento debe realizarse en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina (HE), en el campo de 20X con mayor densidad de DTF, seleccionado tras evaluar los 10 campos con mayor cantidad de estructuras presentes (o “hotspots”). El resultado debe dividirse por un factor de normalización de acuerdo al microscopio utilizado para obtener una estimación equivalente al número de estructuras presentes en  $0,785\text{mm}^2$ . De acuerdo al valor obtenido, el grado de DTF se clasifica de la siguiente forma: bajo (menos de 5), intermedio (de 5 a 9) y alto (superior a 10).

La utilidad de la inmunotinción para CKAE1/AE3 ha sido evaluada por varios autores, y parece mejorar la reproducibilidad y la concordancia interobservador de la gradación de la DTF.<sup>4,7,22,26,29,37,40,51</sup> Aunque la guía de consenso de la ITBCC recomienda la valoración de la DTF en la tinción de HE, reconoce la utilidad de la inmunotinción en los casos de difícil valoración por un denso infiltrado estromal y/o inflamatorio, y sostiene que esta recomendación podría cambiar en los próximos años a medida que se acumule más evidencia a favor del uso de la tinción inmunohistoquímica.<sup>2,7</sup>

Tabla 1: Métodos de valoración de DTF descritos en la literatura desde 1989 hasta la actualidad.		
<b>Autor</b>	<b>Método de valoración</b>	<b>Gradación</b>
Morodomi y col, 1989. <sup>34</sup>	Valoración en HE. Recuento en un área de 500um x 2500um, en cuatro puntos de cada preparación. Finalmente se calcula el promedio.	Negativo (-): 0 a 4. Positividad leve (+): 5 a 15 Positividad intensa (++) : más de 15.
Hase y col, 1993. <sup>27</sup>	Valoración en HE. Evaluación cualitativa de acuerdo al patrón predominante en el espécimen.	Leve (BD1) Moderado a severo (BD2)
Ueno y col, 2002. <sup>3</sup>	Valoración en HE en un campo de 25X (0,385mm <sup>2</sup> ) previa selección subjetiva de la zona con mayor cantidad de DTF.	Recuento inferior a 5. Recuento de 5 a 10. Recuento superior a 10.
Jass y col, 2003. <sup>52</sup>	Valoración en HE. Recuento en un campo de 40X.	Ausente: recuento inferior a 5. Presente: recuento superior a 5.
Ueno y col, 2004. <sup>35</sup>	Valoración en HE. Revisión de todas las preparaciones histológicas y selección de aquella con mayor densidad de DTF. Recuento en un campo de 250X (700um).	Bajo grado: recuento de 0 a 9. Alto grado: recuento superior a 10.
Ueno y col, 2004. <sup>36</sup>	Valoración en HE. Revisión de todas las preparaciones histológicas y selección de aquella con mayor densidad de DTF. Recuento en un campo de 200X (0,785 mm <sup>2</sup> ).	Negativo: recuento inferior a 5. Positivo: recuento superior a 5.
Prall y col, 2005. <sup>39</sup>	Valoración en inmunotinción para CKAE1/AE3. Revisión de todas las preparaciones histológicas y selección de aquella con mayor densidad de DTF. Inmunotinción para CKAE1/AE3 en el bloque seleccionado. Recuento en un campo de 250X (0,785 mm <sup>2</sup> ) en la inmunotinción.	Se estableció un de punto de corte mediante el análisis de la curva ROC ( <i>receiver operating characteristic</i> ), en 25 buds por campo: Bajo grado: recuento inferior a 25 Alto grado: recuento superior a 25.
Nakamura y col, 2008. <sup>38</sup>	Valoración en HE. El margen de invasión neoplásico en todas las secciones histológicas fue examinado a 200X y 400X. Se valoró la extensión de la DTF de la siguiente forma: Ninguno: Ausencia de DTF Leve: DTF en menos de 1/3 de todo el frente invasor. Moderado: DTF en 1/3 a 2/3 de todo el frente invasor. Marcado: TDF en más de 2/3 de todo el frente invasor.	El grado de DTF fue categorizado en dos grupos: Bajo grado: incluye a los casos sin DTF y a los que muestran DTF leve. Alto grado: DTF moderado y marcado.

Wang <i>y col</i> , 2009. <sup>33</sup>	<p>Valoración en HE.</p> <p>Método convencional: Todas las preparaciones fueron escaneadas a 40X para seleccionar las 5 áreas con mayor densidad de DTF en cada laminilla. El recuento se realizó utilizando un objetivo de 200X (0,94985mm<sup>2</sup>).</p> <p>Método rápido: Todas las preparaciones fueron escaneadas a 40X para seleccionar las 5 áreas con mayor densidad de DTF en cada laminilla. Se valoró la presencia de DTF en términos de “positivo” en los campos con recuento igual o superior a 1 o “negativo” en los campos sin evidencia de DTF, utilizando el objetivo de 200X (0.94985mm<sup>2</sup>).</p>	<p>Método convencional: La media del recuento obtenido fue considerado como el índice de DTF en cada caso.</p> <p>Método rápido: Los casos fueron clasificados como:</p> <p>DTF positiva si más de 50% de los campos examinados eran positivos.</p> <p>DTF negativa: cuando menos de 50% de los campos positivos.</p>
Mitrovic <i>y col</i> , 2012. <sup>7</sup>	Método de Ueno <i>y col</i> . <sup>36</sup> En los casos donde la valoración en HE era más difícil, utilizaron la inmunotinción para CKAE1/AE3 para diferenciar las células tumorales de la DTF, del estroma y de las células inflamatorias.	<p>Negativo: recuento inferior a 5.</p> <p>Positivo: recuento superior a 5.</p>
Ueno <i>y col</i> , 2012. <sup>44</sup>	Valoración en HE. El recuento se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el año 2004 por estos autores. <sup>36</sup>	<p>Grado 1: recuento inferior a 5.</p> <p>Grado 2: recuento de 5 a 9.</p> <p>Grado 3: recuento superior a 10.</p>
Horcic <i>y col</i> , 2013. <sup>40</sup>	<p>Valoración en inmunotinción para CK22.</p> <p>Método de 1HPF: Recuento en 1 CGA (0.49mm<sup>2</sup>) previa selección de la zona con mayor densidad de DTF.</p> <p>Método de 10 HPF: Recuento en 10 CGA (0.49mm<sup>2</sup>) previa selección de la zona con mayor densidad de DTF. Para el análisis final se utilizó el promedio del valor obtenido en cada caso. Adicionalmente evalúan en la tinción para CK22 la DTF utilizando los métodos de Nakamura, Hase, Ueno, y el método de Wang rápido.<sup>27,33,36,38</sup> El método de Wang rápido fue modificado estableciendo como punto de corte un recuento superior o inferior a 9.</p>	Mediante el análisis de la curva ROC se establecieron los puntos de corte para Hazard ratios de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0.
Karamitopolou <i>y col</i> , 2012. <sup>37</sup>	Valoración en inmunotinción para CKAE1/AE3. Todas las secciones tumorales fueron evaluadas a bajo aumento y aquella con la mayor densidad de DTF fue seleccionada para el estudio inmunohistoquímico. En la inmunotinción para CKAE1/AE3, se realizó el recuento en 10 campos de 400X. Para la gradación de los casos se calculó el promedio de DTF en cada caso.	<p>Bajo grado: recuento inferior a 10.</p> <p>Alto grado: recuento superior a 10.</p>
ITBCC, 2017	Valoración en HE. Recomiendan realizar el recuento en el campo de 20X con mayor densidad de DTF, seleccionado tras evaluar los 10 campos con mayor cantidad de estructuras presentes (o “hotspots”). El resultado debe dividirse por un factor de normalización para obtener una estimación equivalente al número de estructuras presentes en 0,785mm <sup>2</sup> .	<p>Bajo: menos de 5.</p> <p>Intermedio: de 5 a 9.</p> <p>Alto: superior a 10.</p>

#### **1.4.- Transición epitelio mesenquimal**

La TEM es el proceso biológico mediante el cual la célula epitelial sufre una serie de cambios bioquímicos que le confieren propiedades características de las células mesenquimales. Este proceso es esencial para la vida y ocurre de forma fisiológica durante el desarrollo embriológico, la organogénesis fetal, la cicatrización de heridas y la fibrosis.<sup>53,54</sup> La activación del programa de TEM es el principal mecanismo responsable de la adquisición del fenotipo maligno en las células epiteliales, generando un incremento en su capacidad migratoria y de invasión, fundamentales en la progresión del cáncer y en el desarrollo de metástasis.<sup>5,54</sup> Se trata de un proceso reversible, pues una vez que las células alcanzan el órgano diana, crecen formando estructuras que remedan al tumor original, es decir sufren una transformación inversa o transición mesenquimal-epitelial (TME).

En el CCR la TEM es uno de los mecanismos carcinogénicos más importantes en la patogenia de la enfermedad.<sup>5,55-57</sup> La reciente clasificación molecular de consenso del CCR, reconoce la existencia de un subtipo de peor pronóstico o CMS4 de tipo mesenquimal, que cursa con una significativa sobre activación de genes relacionados con TEM: activación de la vía TGF- $\beta$  y sobre expresión de genes reguladores de angiogénesis, diferenciación de célula madre o “*stem cell*”, remodelación de la matriz extracelular y activación de la inflamación mediada por el complemento.<sup>1</sup>

Uno de los eventos determinantes en el proceso de TEM es la disolución de las uniones de adherencia intercelular por alteraciones en las proteínas de superficie especializadas que conforman los sistemas de adhesión entre las células epiteliales: uniones estrechas, uniones adherentes,

desmosomas y uniones gap. Durante la desestabilización de las uniones adherentes, la E-cadherina se desplaza de su localización habitual en la membrana celular, al citoplasma donde es degradada. Bajo estas circunstancias, B-catenina es translocada al núcleo como parte de la vía canónica *WNT* (*Wingless signaling pathway*) donde actúa como un coactivador de factores de transcripción la familia TCF (*T cell factor*) entre otros.<sup>58</sup> Una vez activado el proceso de TEM, ocurre una modificación en la composición y la distribución de los filamentos de actina. La disolución de las uniones intercelulares donde normalmente se encuentran ancladas las fibras de actina, ocasiona la reorganización de las mismas y la formación de “fibras de estrés de actina” (*actin stress fibers*) ancladas a complejos de adhesión focal (CAF) en la membrana celular, responsables de la movilidad y la migración celular (lamelopodias y filopodias).<sup>53,59</sup> Los cambios en la red de microtúbulos promueven la fuerza necesaria durante la migración. Los filamentos intermedios de citoqueratina son sustituidos por vimentina, lo que incrementa la movilidad celular.<sup>59</sup> Los cambios en los componentes de la matriz extracelular que rodean a estas células, como son el incremento del contenido de colágeno y fibronectina, aumentan las señales dependientes de integrina y la formación de CAF que incrementan la movilidad celular. Todas estas alteraciones ocasionan finalmente la pérdida de la polaridad ápico-basal normal y la adquisición de una polaridad adelante-atrás (“*front-back polarity*”) que aunado a la producción de metaloproteinasas (MMPs), permiten que la célula migre de forma direccional.<sup>53,60</sup>

## **1.5.- Mecanismos moleculares reguladores del proceso de TEM**

La iniciación y regulación de la transición epitelio mesenquimal es el resultado de una armónica y compleja interacción y colaboración entre diferentes factores y vías reguladoras entre los que se encuentran:

- Señales inductoras producidas por las células estromales asociadas al tumor como son: TGF- $\beta$ , (HGF) (*hepatocyte growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*) y PDGF (*placental-derived growth factor*), que estimulan la producción de factores de transcripción en las células epiteliales.<sup>54,61</sup>
- Factores de transcripción como zeb (*zinc finger E-box-binding homeobox 1*), Smad y HLH (*Helix-loop-helix family factors*) que se unen a las regiones promotoras de importantes genes involucrados en la adquisición del fenotipo mesenquimal.<sup>53,54,60,61</sup>
- La activación de importantes vías reguladoras como la vía *WNT*, *NOTCH*, la activación de *SMAD2/3* (*mothers against decapentaplegic homologs 2 and 3*) independiente de TGF- $\beta$ , entre otros.<sup>53,58,61,62</sup>

### **1.5.1.- ZEB (*zinc finger E-box-binding homeobox*)**

La familia de factores de transcripción zeb, incluye dos miembros: zeb1 también conocida como  $\delta$ EF1 y zeb2 también conocida como SIP1 (*SMAD interacting protein 1*), codificadas por dos genes independientes: *ZFHX1A* y *ZFHX1B* respectivamente.<sup>63</sup> Estas proteínas se encuentran constituidas por un dominio central rodeado de dos terminaciones ricas en zinc (*zinc fingers*), cada una de las cuales puede unirse de forma independiente a

secuencias CACCT(G) de regiones promotoras de importantes genes involucrados en la construcción de uniones intercelulares, como el gen *CDHI* que codifica la proteína E-cadherina, y los genes de las proteínas claudin-4 y zónula occludens-3 (ZO-3).<sup>60,63,64</sup> La expresión de *ZEB1* y *ZEB2* juega un papel fundamental en la regulación de la TEM durante el desarrollo embriológico de la cresta neural, el corazón, el músculo esquelético y las células hematopoyéticas.<sup>61,64</sup> En modelos experimentales se ha probado que la sobreexpresión de *ZEB* es suficiente para inducir la disociación de las uniones adherentes, la pérdida de la polaridad celular y el incremento en la producción de MMPs responsables de la remodelación de la matriz extracelular.<sup>61,63,64</sup> El incremento en la expresión de *ZEB* es, en la mayor parte de los casos, el resultado de la acción de las proteínas smads, durante la activación de la vía TGF- $\beta$ , uno de los principales desencadenantes y reguladores del proceso de TEM en el CCR.<sup>60,62,65-70</sup> Se han descrito otros mecanismos que producen un incremento en la expresión de *ZEB* como son la acción directa de factores de transcripción como: Snail (sin intervención de TGF- $\beta$ ), p53 y p63 y la activación de las vías Ras-*MAPK*, y *WNT*.<sup>20,58,71,72</sup>

## **1.6.- microRNAS**

Los miRNAs son pequeñas secuencias de RNA no codificante que contienen aproximadamente 20 nucleótidos y que regulan la expresión genética post-transcripcional, a través de la unión al mRNA diana.<sup>73</sup> Los miRNAs se originan a partir de “precursores en bucles” (*hairpin precursors*) localizados generalmente en secuencias intrónicas del DNA genómico. Una vez que son transcritos, estas moléculas sufren un proceso madurativo

intranuclear y citoplasmático a través de la acción de la enzima Drosha, una RNAsa tipo III, y finalmente son incorporados al complejo proteico RISC (*RNA-induced silencing complex*) para el reconocimiento de su diana a través de la unión de su región 5' con la región 3'UTR (*untranslated region*) del mRNA.<sup>12,74</sup> La especificidad de la unión entre un miRNA y su diana depende de la secuencia de unión o “*seed sequence*” localizada en la región 5' del miRNA.<sup>12</sup> Actualmente existen 1.881 miRNAs descritos en humanos ([www.miRbase.com](http://www.miRbase.com)) que regulan la producción de más de 2/3 de todas las proteínas.<sup>75</sup> Un miRNA puede regular los componentes de múltiples vías moleculares simultáneamente, actuando por lo tanto como un gen supresor tumoral o como un protooncogen, lo que lo convierte en un interesante objeto de estudio y una atractiva diana terapéutica.<sup>9,76,77</sup> (Figura 1)

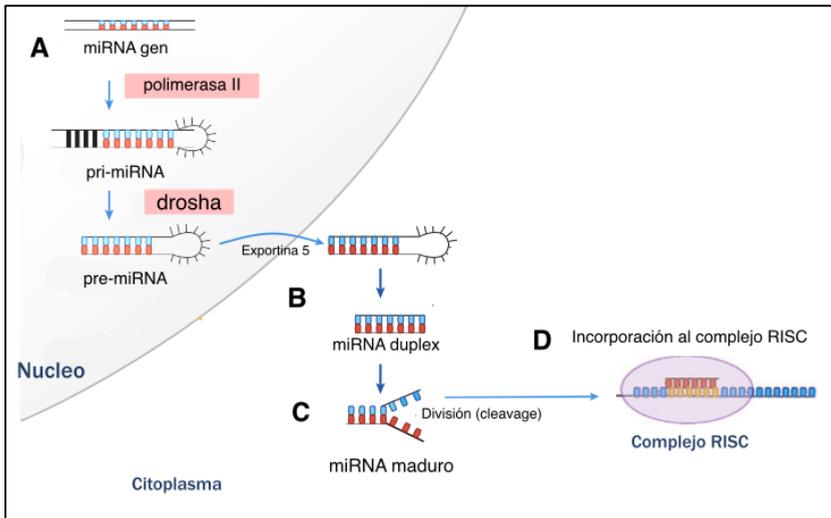


Figura 1: Proceso de síntesis de miRNAs. A. La secuencia que codifica el miRNA es transcrita por la polimerasa II generando transcritos de longitud variable o pri-RNA que son reconocidos por la enzima Drosha (una RNAsa tipo III), que genera un precursor con forma de bucle o “*hairpin precursor*” llamado pre-miRNA. B. El pre-miRNA es exportado al citoplasma por la enzima exportina 3, donde otra RNAsa, la enzima Dicer, lo reconoce generando un fragmento más pequeño con dos cadenas de RNA (miRNA dúplex). C. Mediante un proceso de separación y división, una de las dos cadenas de RNA es eliminada, y la cadena restante o miRNA maduro se incorpora al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*). D. El miRNA maduro se une al mRNA diana e induce al complejo RISC a impedir su traslación.

### 1.6.1- La familia miR200

La familia de microRNAs miR200, consta de 5 miembros: miR-141, miR-429, miR-200a, miR-200b y miR-200c, codificados por regiones genéticas diferentes. Los genes de miR-200a, miR-200b, y miR-429 están localizados en el cromosoma 1, y los de los miR-200c y miR-141 en el cromosoma 12.<sup>12</sup> (Figura 2) miR-200b, miR-200c y miR-429 comparten la misma secuencia de unión (*seed sequence*) conformada por los nucleótidos AAUACUG; mientras que miR-200a y miR-141 comparten la secuencia de unión AACACUG.<sup>12</sup>

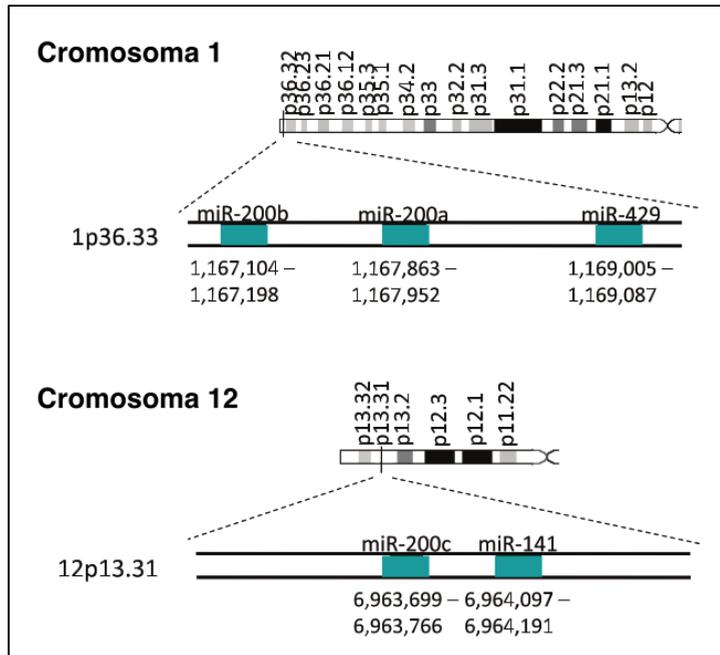


Figura 2: Los genes de miR-200a, miR-200b, y miR-429 están localizados en el cromosoma 1, y los genes de miR-200c y miR-141 en el cromosoma 12.

Existe una amplia evidencia científica que señala el papel de miR200 como un importante inhibidor de la transformación neoplásica epitelial en varios tumores incluyendo el CCR.<sup>12,78–85</sup> Uno de los principales motivos por los que miR200 actúa como un supresor tumoral en el CCR es su acción inhibitoria sobre el mRNA de los factores de transcripción zeb, conservando la expresión de E-cadherina y por lo tanto inhibiendo el proceso de TEM.<sup>12,80,81,85</sup>

## **1.7.- Evasión de la respuesta inmune en las zonas de DTF**

La evasión de la respuesta inmune es uno de los mecanismos esenciales para la progresión neoplásica y la resistencia a tratamientos. En este proceso, se desarrolla un estado de “tolerancia” en el que participan células inmunes reguladoras, citoquinas inmunosupresoras y los llamados “*immune checkpoint blockade*” (ICPB) o puntos de bloqueo de la respuesta inmune.<sup>86</sup> Dos de las moléculas más importantes que participan en el mecanismo de ICPB son “*T-lymphocyte-associated protein-4*” (CTLA-4) y “*programmed death-1*” (PD-1). CTLA-4 actúa fundamentalmente en las células T CD4 durante el proceso de “*priming*” (impronta) o reconocimiento antigénico inicial, que ocurre en el ganglio linfático y que modula la activación de los linfocitos T CD8 por las células APC (*antigen-presenting cells* o células presentadoras de antígenos) que han reconocido a los antígenos neoplásicos.<sup>86,87</sup> Una vez activadas tanto las células T CD4 como CD8, migran al microambiente tumoral donde secretan interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) que actúa favoreciendo la destrucción tumoral, pero que al mismo tiempo, estimula la expresión de PD-L1 (*programmed death ligand-1*) por los macrófagos y las células tumorales.<sup>86</sup> PD-1 es una proteína de superficie perteneciente a la familia CD28, que se expresa en los linfocitos T activados, especialmente en los linfocitos T intratumorales, y en otras células activadas no T como linfocitos B, células NK (“*natural killer*”) y macrófagos.<sup>88</sup> La unión de PD-1 con su ligando PD-L1 (también conocido como CD279 o PDCD1) inhibe la proliferación y la función de las células T CD8, induce la apoptosis y promueve la diferenciación de las células T CD4+ a células T reguladoras de tipo Foxp3+, limitando de esta forma la respuesta de los linfocitos T, y favoreciendo la tolerancia del sistema

inmune frente a los antígenos tumorales.

Los avances en el entendimiento de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune, han permitido el desarrollo de fármacos inhibidores de las vías de ICPB como son: el anticuerpo contra CTLA-4 o ipilimumab, contra PD-1, nivolumab o pembrolizumab, y contra PD-L1 como atezolizumab y avelumab.<sup>87</sup> En mayo del año 2017, la FDA (US Food and Drug Administration) aprobó el uso de pembrolizumab en tumores sólidos con inestabilidad de microsátélites (IMS) irresecables o que han progresado a otras líneas de tratamiento; y en junio del mismo año aprobó el uso nivolumab en el CCR metastásico en progresión tras el tratamiento con fluoropirimidinas, oxaliplatino e irotectan. El estado del sistema de reparación de microsátélites (*mismatch repair* o MMR) es, hasta ahora, el único factor predictivo de respuesta clínica al tratamiento con inhibidores de PDL1 en pacientes con CCR, en los que se ha observado una respuesta clínica satisfactoria cuando existe un alto nivel de inestabilidad de microsátélites (IMS-H).<sup>89-92</sup>

### **1.8.- La vía de retroalimentación miR200-TGF- $\beta$ -ZEB en la regulación del proceso de TEM y su relación con la expresión de PD-L1**

En modelos experimentales se ha comprobado que la activación mantenida de TGF- $\beta$  induce la metilación reversible de miR200 y, por lo tanto, inhibe la transcripción del gen.<sup>93</sup> Este efecto inhibitorio sobre miR200 se ve reforzado por el incremento de la expresión de ZEB (como consecuencia de la activación de TGF- $\beta$ ), que se une al promotor de miR200 e impide su transcripción.<sup>10,11,64</sup> Por otra parte, se ha demostrado que miR200c reprime la

expresión de TGF- $\beta$ 2 y de SMAD2, cerrando de esta forma lo que se ha definido como la “vía de señalización autocrina TGF- $\beta$ /ZEB/miR200”.<sup>11,93</sup> La acción de esta vía parece ejercer un papel importante en la regulación de la expresión de *PD-L1*. En modelos celulares de cáncer de mama y pulmón, se ha demostrado que la unión directa entre miR200 y el extremo 3'UTR de *PD-L1* inhibe la transcripción de este último.<sup>94,95</sup> Por otro lado, la supresión de la expresión de miR200 conlleva a un incremento de la expresión de *ZEB1* y de *PD-L1*, lo que conduce a la transición mesenquimal de las células epiteliales y a una reducción del total de linfocitos T CD8 intratumorales efectivos. Por lo tanto, el eje miR200-*ZEB1* podría constituir una vía directa de supresión de la respuesta inmune antitumoral, añadida a la acción del TGF- $\beta$  en el contexto de la TEM.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### **2.1- Hipótesis**

En aquellos tejidos donde la TEM es el mecanismo tumoral más importante: en las zonas del tumor que muestran DTF de alto grado y en los casos de CCR más agresivo y de peor pronóstico, suponemos que los niveles de expresión de miR200 son considerablemente inferiores y por lo tanto, sus principales dianas implicadas en el proceso de TEM: *ZEB1* y *ZEB2* se encuentran sobre expresadas. Como parte del mecanismo de resistencia inmune en los tumores con DTF de alto grado, los niveles de expresión de *PD-L1* son superiores en estas áreas.

### **2.2- Objetivo general**

Conocer las variaciones de expresión de miR200, *ZEB* y *PD-L1* en relación con el patrón de invasión de la lesión y el grado de DTF; y determinar su utilidad como biomarcador con valor pronóstico para identificar casos de CCR de alto riesgo.

### **2.3- Objetivos específicos**

1. Comparar tres (3) métodos de evaluación de DTF con la finalidad de seleccionar aquel que muestre una mayor capacidad predictiva de recaídas y/o mortalidad, y una mayor correlación con factores histopatológicos de mal pronóstico en el CCR.

2. Estudiar la expresión de moléculas implicadas en el proceso de TEM (miR200 y *ZEB*) y conocer sus variaciones en función de la zona tumoral evaluada y el grado de DTF.
3. Determinar si el grado de DTF y la expresión de moléculas implicadas en el proceso de TEM (miR200 y *ZEB*) influyen significativamente en la expresión de *PD-L1* en el CCR.
4. Valorar la utilidad del estudio de la expresión de miR200, *ZEB* y *PD-L1* como biomarcadores con valor pronóstico para la estratificación de riesgo en los pacientes con CCR.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### **3.1- Muestra a estudio**

Evaluamos de forma retrospectiva una serie de 125 casos de cáncer de colon diagnosticados consecutivamente en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia en un periodo de 14 meses (desde enero 2012 hasta marzo 2013). Los datos clínicos y el seguimiento de los pacientes fueron extraídos de la historia clínica hospitalaria una vez obtenida la aprobación del proyecto por el comité de ética de la Fundación Biosanitaria INCLIVA.

##### **3.1.1- Criterios de exclusión:**

- Neoplasias localizadas en recto.
- Pacientes con antecedente de CCR.
- Pacientes con tumores intestinales sincrónicos.
- Tumores extensamente abcesificados, necrosados o con mala fijación en los que la valoración morfológica se encontraba limitada.

#### **3.2- Estudio inmunohistoquímico**

Todas las técnicas inmunohistoquímicas realizadas para este estudio se llevaron a cabo de forma automatizada utilizando el sistema Autostainer Link 48 (Agilent Technologies, Glostrup, Dinamarca) con los anticuerpos monoclonales: CKAE1/AE3 (Dako, Ac prediluido, clon IR053, pH bajo),

MLH1 (Dako, Ac prediluido, clon IR079, pH alto), MSH2 (Dako, Ac prediluido, clon IR085, pH alto), MSH6 (Dako, Ac prediluido, clon IR086, pH alto), y PMS2 (Dako, Ac prediluido, código IR087, pH alto).

### **3.3.- Valoración de la DTF**

Consideramos como DTF la presencia de células tumorales sueltas o en pequeños grupos de menos de 5 células localizadas en el estroma del frente invasor tumoral, sin continuidad con la masa neoplásica principal. Con la finalidad de seleccionar la sección tumoral más representativa, todas las preparaciones histológicas de cada caso fueron reevaluadas con el objetivo de 10X. La preparación con mayor densidad de DTF en el frente invasor fue seleccionada y en cada una de ellas realizamos una sección adicional para el estudio inmunohistoquímico de citoqueratinas de amplio espectro (CKAE1/AE3). Valoramos el grado de DTF utilizando tres métodos diferentes (Figura 3):

**Método 1** o método recomendado por la ITBCC<sup>2</sup>: en la preparación previamente seleccionada y teñida con HE, analizamos todo el frente invasor con el objetivo de 10X y seleccionamos la zona con mayor densidad de DTF. En esta última contamos el número de estructuras presentes en un (1) campo utilizando el objetivo de 20X.

**Método 2** o método de recuento en 10 campos: en la preparación previamente seleccionada y teñida con HE, analizamos todo el frente invasor con el objetivo de 10X y seleccionamos la(s) zona(s) con mayor densidad de DTF. Posteriormente contamos el número de estructuras tumorales presentes en los

10 campos con mayor densidad de DTF utilizando el objetivo de 20X. El promedio del valor obtenido en los 10 campos fue utilizado para la gradación.

**Método 3** o método recomendado por la ITBCC en la inmunotinción para CKAE1/AE3: analizamos todo el frente invasor con el objetivo de 10X y seleccionamos la zona con mayor densidad de DTF. En esta última contamos el número de estructuras presentes en un (1) campo utilizando el objetivo de 20X.

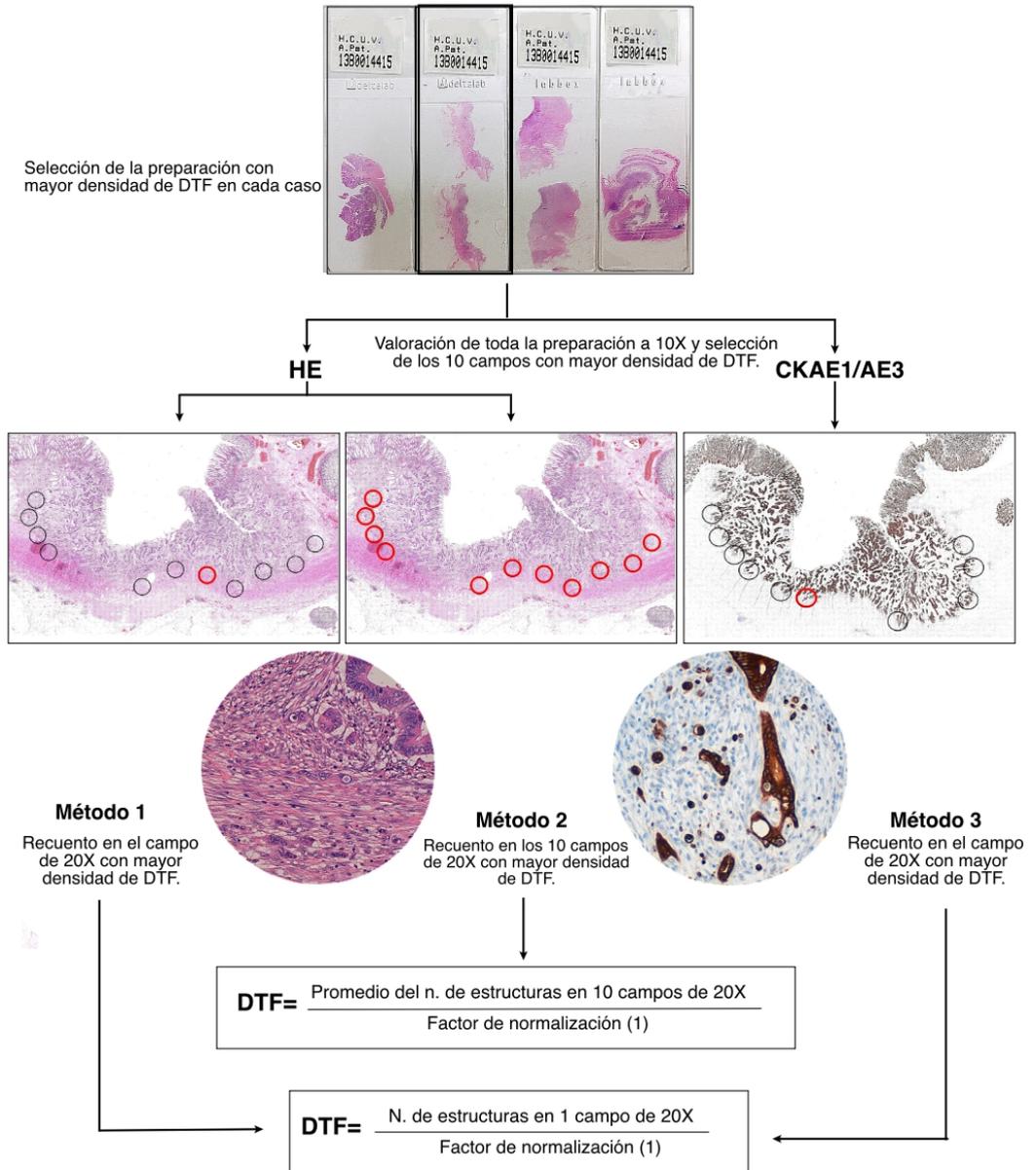


Figura 3: Diagrama del procedimiento utilizado para valorar la DTF. En los métodos 1 y 2 realizamos el recuento en HE, y en el método 3 realizamos el recuento en la inmunotinción para CKAE1/AE3. En todos los casos todas las preparaciones histológicas fueron previamente evaluadas con el objetivo de 10X para seleccionar la sección más representativa.

En los tres métodos de valoración utilizamos el objetivo de 20X de la marca Leica® que ocupa un campo visual con un área de 0,785mm<sup>2</sup>, por lo que no fue necesario normalizar el valor obtenido (el valor de normalización es igual a 1). En todos los casos, el recuento de DTF se ha realizado considerando solo aquellas células con núcleo para evitar la sobre estimación debida al efecto de fragmentación celular. (Figura 4)

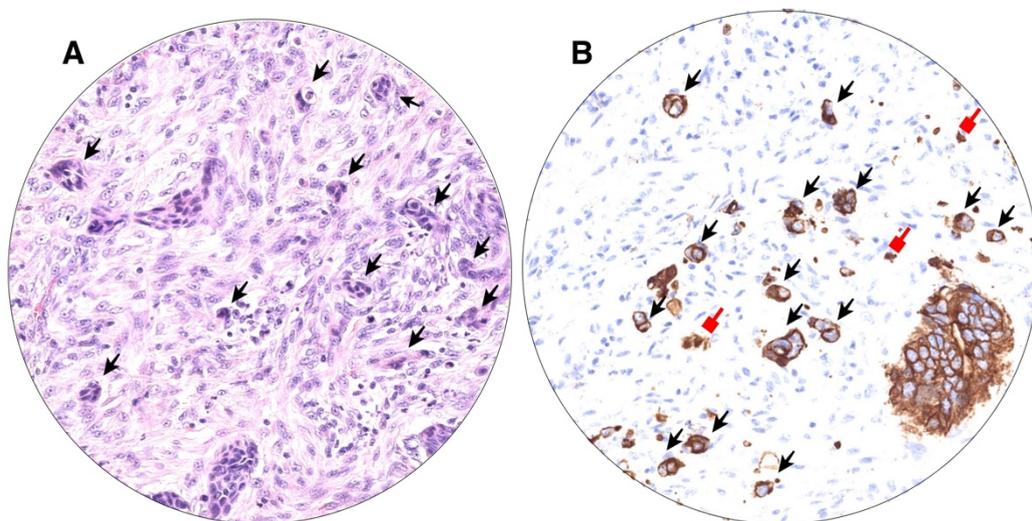


Figura 4: Valoración de la DTF en las preparaciones teñidas con HE (A) y en la inmunotinción para CKAE1/AE3 (B). Solo consideramos para el recuento de la DTF las células con núcleo (señaladas con flecha negra) obviando los fragmentos celulares anucleados más evidentes en la inmunotinción para CKAE1/AE3 (señaladas con el cuadrado rojo).

Una vez realizada la evaluación mediante los tres métodos, los casos fueron estratificados en tres grados de DTF utilizando los criterios de la clasificación de consenso ITBCC de la siguiente forma:

Tabla 2: Gradación de la DTF de acuerdo a la ITBCC.			
	<b>Bajo</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Alto</b>
<b>Métodos 1 y 3</b>	0-4	5-9	10 o más
<b>Método 2</b>	0-4,5	4,5-9,5	9,5 o más

En la misma preparación seleccionada para el estudio de la DTF, valoramos los siguientes parámetros histopatológicos: grado de diferenciación tumoral, patrón de invasión, presencia de invasión linfovascular, presencia de invasión perineural, índice mitótico en 10 campos de gran aumento (CGA) e índice apoptótico en 10 CGA.<sup>28</sup> Estos dos últimos parámetros fueron evaluados tanto en el centro del tumor como en las estructuras de DTF en el frente invasor. En la valoración del índice apoptótico únicamente consideramos los cuerpos apoptóticos intraepiteliales, lejos de zonas de necrosis. En las zonas de DTF valoramos la presencia de emperipolesis, definida como la presencia de una célula epitelial dentro de otra célula epitelial, generalmente incluida en una vacuola intracitoplasmática. Realizamos un recuento del número de dichas estructuras presentes en 10 CGA.

### **3.4- Valoración de la expresión de proteínas de la vía reparadora de DNA**

En la valoración de la expresión de las proteínas de la vía reparadora del DNA, consideramos como control interno positivo la tinción nuclear en linfocitos, células estromales y mucosa normal. El resultado del estudio inmunohistoquímico fue interpretado de la siguiente forma (Figura 5):

- Expresión conservada: cuando se observa positividad nuclear en las células tumorales con control interno positivo.

- Pérdida de expresión: cuando se observa ausencia de tinción nuclear en las células tumorales con control interno positivo.
- No valorable: cuando no se observa control interno. En este último caso se consideró la técnica como errónea y la misma fue repetida en nuevos cortes.

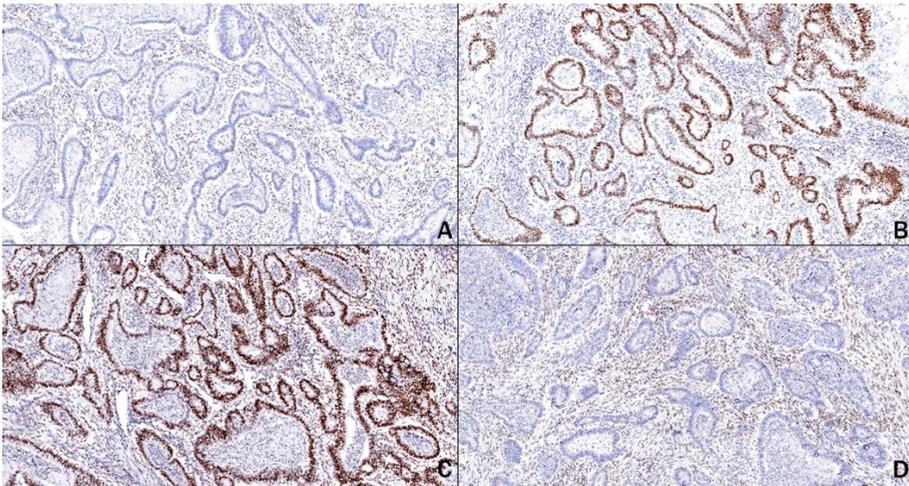


Figura 5. Valoración de la expresión inmunohistoquímica de proteínas de la vía reparadora del DNA. Pérdida de expresión inmunohistoquímica de MLH1 (A) y PMS2 (D) con control positivo en las células estromales. Inmunotinción nuclear conservada en las células tumorales para MSH6 (B) y MSH2 (C).

### **3.5- Extracción de material genético**

El tejido tumoral para la extracción de material genético, se obtuvo a través de cilindros del bloque de parafina correspondiente a la preparación seleccionada para la valoración de la DTF. Seleccionamos en cada caso las zonas más representativas tanto en el centro del tumor, como en el frente

invasor con mayor densidad de DTF. Se obtuvieron 2 a 3 cilindros de cada zona (centro tumoral y frente invasor) y se introdujeron en tubos eppendorf de 2ml para la extracción de DNA y RNA. Las muestras fueron desparafinadas utilizando una solución desparafinadora (Deparaffinization Solution, Quiagen). La extracción del DNA genómico y del RNA total incluyendo el RNA de pequeño tamaño o sRNA (y microRNAs), se realizó mediante el filtrado por columnas utilizando el kit Allprep DNA/RNA FFPE Kit (Quiagen). Ambas fracciones (DNA y RNA) fueron purificadas a partir del mismo material, separando después de la lisis con proteinasa K, el sobrenadante para extracción de RNA y el precipitado para extracción de DNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El precipitado para la extracción de DNA fue incubado a 56° durante 2 horas con proteinasa K. La extracción de ambas fracciones (DNA y RNA) se realizó de forma automatizada utilizando el sistema Qiacube (Quiagen) obteniendo finalmente el RNA eluído en 30µl de agua libre de RNasa y el DNA eluído en 60µl de buffer ATE. Las concentraciones del material obtenido fueron medidas utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente fueron almacenadas a -20°C (DNA) y -80°C (RNA). El DNA se mantuvo almacenado para futuros estudios.

### **3.6.- Transcripción reversa (RT-PCR)**

#### **3.6.1- Estudio de miRNAs**

Para el estudio de expresión de miRNAs, sintetizamos cDNA (DNA complementario) a partir del RNA mediante una transcripción reversa (RT-PCR) utilizando el kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit

(Applied Biosystems™). Para esta reacción utilizamos los siguientes cebadores:

Tabla 3: cebadores utilizados para la RT-PCR de los miRNAs.		
	Código	Secuencia
hsa-miR-200a-3p	MIMAT0000682 <sup>+</sup>	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318 <sup>+</sup>	UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA
hsa-miR-200c	MIMAT0000617 <sup>+</sup>	UAAUACUGCCGGGUAUGAUGGA
RNU6B	NR_002752*	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGT GAAGCGTTCATATTTTT

<sup>+</sup> miRbase reference \*NCBI reference.

RNU6B fue utilizado como control endógeno. Elaboramos un pool de cebadores utilizando 2,5µl de cada uno (todos se encontraban en concentraciones de 20X) y 990µl de buffer TE, para obtener una concentración final de 0,05X de cada primer en un volumen final de 1.000ul. Teniendo en cuenta las concentraciones de RNA obtenidas tras la extracción, decidimos llevar cada caso hasta una concentración de RNA de 30ng/dl para utilizar un volumen de RNA de 6ul en cada reacción de RT-PCR, equivalente a 180ng de RNA por reacción. Por este motivo, ajustamos los volúmenes para la mezcla de la RT-PCR (master mix) sugeridos en el protocolo del fabricante (RT pools using TaqMan® MicroRNA Assays, Thermo Fisher Scientific) duplicando la cantidad de cada reactivo para obtener un volumen final de 12µl (Tabla 4). Finalmente preparamos la mezcla para la RT-PCR para obtener un volumen final de 30µl por cada caso (Tabla 5). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 30min a 16°C, 30min a 42°C y 5min a 85°C con un descenso final a 4° en el que permanece la muestra hasta su manipulación.

Tabla 4: volúmenes utilizados para la RT-PCR (master mix) por cada muestra para el estudio de miRNAs.	
	Volumen (μl)
dNTPs	0,60
Enzima transcriptasa reversa	6,00
RT buffer	3,00
Inhibidor de la RNasa	0,38
Agua libre de nucleasas	2,02

Tabla 5: Volúmenes finales para RT-PCR por cada muestra para el estudio de miRNAs.	
	Volumen (μl)
RNA diluido a 30nd/dl	6,00
Pool de cebadores	12,00
Master mix	12,00

### 3.6.2- Estudio de expresión de *ZEB1*, *ZEB2* y *PD-L1*

Para el estudio de expresión de mRNA, sintetizamos cDNA a partir del RNA mediante una transcripción reversa (RT-PCR) utilizando el kit TaqMan<sup>®</sup> High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems<sup>™</sup>). En este caso la síntesis de cDNA se basó en el uso de cebadores aleatorios (Tabla 6). Condiciones de amplificación: 10min a 25°C, 120min a 37°C y 5min a 85°C.

Tabla 6: Volúmenes utilizados para la RT-PCR para el estudio de mRNA	
	Volumen (μl)
RNA diluido a 30nd/dl	6,00
Tampón RT 10X	1,00
dNTPs	0,40
Cebadores aleatorios 10X	1,00
MultiScribe <sup>™</sup> Reverse Transcriptase	0,50
Inhibidor de RNasa	0,50
H2O	0,50

El estudio de mRNA, requirió una preamplificación del material genético. Para ello se preparó una mezcla a concentración 0,01 de las sondas que iban a ser empleadas en la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) (Tabla 7). Finalmente utilizamos el kit TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems™) y preparamos la mezcla de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Tabla 8).

Tabla 7. Cebadores utilizados para la preamplificación del cDNA y para la qRT-PCR.	
	Secuencia
zeb1	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
zeb2	UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA
Cd (PD-L1)	UAAUACUGCCGGGUAUGAUGGA

Tabla 8: Volúmenes utilizados en la preamplificación para el estudio de mRNA	
	Volumen (ul)
cDNA	2,50
Taqman Mix	6,00
Pool de sondas	3,00
H2O	12,00

Las preparaciones se incubaron en las siguientes condiciones: 10 min a 95°C, 15seg a 95°C y 4 min a 60°C, con un descenso final a 4° en el que permaneció la muestra hasta su manipulación. Posteriormente se diluyó el producto de la preamplificación a una concentración 1:10 previamente a la realización de la qRT-PCR para no saturar la reacción de amplificación.

### **3.7.- PCR cuantitativa:**

Los análisis de expresión de miRNAs y mRNAs se llevaron a cabo mediante qRT-PCR empleando el equipo Applied Biosystems™ 7900HT Fast Real-Time PCR system con los kits TaqMan® MicroRNA Assays y TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems™), respectivamente. Utilizamos 1,5µl de cDNA en un volumen final de 10µl por reacción (Tabla 9). Evaluamos las muestras por triplicado, cada una con su control endógeno, en placas de 384 pocillos. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2min a 50°C, 10min a 95°C, 50 ciclos de desnaturalización a 95°C 15seg y de amplificación a 60°C 1 min.

	Volumen (ul)
Cebador específico	1,00
Master mix	5,00
Agua libre de nucleasas	2,50
cDNA	1,5

Finalmente extrajimos los valores de CT de cada caso a una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel 2017. Calculamos para cada triplicado la desviación standard (SD) y ajustamos los valores para obtener una SD inferior a 0,1, eliminando el CT con la mayor desviación (que atribuimos a un error en la qRT-PCR). Con estos valores realizamos un análisis cuantitativo en relación al control endógeno (RNU6B) utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrito por Livak y col<sup>96</sup>

### **3.8.- Análisis estadístico**

Los datos se han analizado utilizando el software estadístico R versión 3.4.2 (Viena, Austria).<sup>97</sup>

#### **3.8.1.- Análisis descriptivo y de asociación**

Hemos realizado una aproximación inicial mediante el estudio descriptivo de todas las variables analizadas: análisis de frecuencias en las variables cualitativas (frecuencias y porcentajes), y análisis numérico en las variables cuantitativas (media, mediana, desviación estándar y percentiles). Construimos diferentes modelos comparativos y analizamos la asociación entre las variables. Para el análisis de asociación entre variables cualitativas utilizamos la prueba  $\chi^2$  de Pearson. Para el análisis de las variables cuantitativas, comparamos las medias y las medianas en los diferentes grupos:

- Para el análisis de las variables cuantitativas independientes realizamos primero el test de Shapiro-Wilk con el objetivo de determinar si los datos mostraban una distribución normal o no. En los casos con un test de Shapiro-Wilk con una  $p$  inferior a 0,05, descartamos la hipótesis nula y asumimos que la distribución de los datos no era normal. En estos casos aplicamos pruebas no paramétricas: el test de Wilcoxon para dos muestras o el test de Wilcoxon para muestras independientes de acuerdo al número de grupos a analizar. En los casos con una distribución normal, valoramos la igualdad de varianzas utilizando el test de Levene y posteriormente aplicamos la prueba T de student para muestras independientes.

- Para el análisis de las muestras dependientes o emparejadas calculamos una nueva variable, la variable diferencia, producto de la resta de ambas variables a estudio. Posteriormente determinamos la presencia o ausencia de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk. En los casos con distribución normal aplicamos la prueba T de student para una muestra, y en los casos con distribución no paramétrica aplicamos el test de Wilcoxon para muestras emparejadas.

Para valorar la relación no lineal entre dos variables cuantitativas utilizamos el test *Rho de Spearman (R)* e interpretamos los valores cercanos a 1 como aquellos con una mayor fuerza de asociación, en sentido directo en el caso de los resultados positivos, y en sentido inverso en el caso de los resultados negativos.

### **3.8.2.- Análisis de supervivencia**

Definimos la supervivencia tumoral específica (STE) como el tiempo que transcurre desde la cirugía con intención curativa hasta que ocurre la muerte como consecuencia de la enfermedad. Consideramos como supervivencia libre de enfermedad (SLE) el tiempo que transcurre desde que se realiza la colectomía con intención curativa hasta que ocurre la primera recaída o la muerte. Aplicamos el test log-rank (test del logaritmo del rango) para comparar las funciones de supervivencia en dos o más grupos de acuerdo a la presencia o ausencia de una determinada variable (variable nominal o variable numérica categorizada). En base a estos resultados construimos las curvas de Kaplan-Meier y calculamos en cada caso el valor de  $p$  mediante el test de  $\text{Chi}^2$  para el análisis de la comparación de las curvas. A continuación, calculamos el HR

(Hazard ratio) asociado a cada variable y sus respectivos intervalos de confianza al 95% utilizando el test de COX. Finalmente, valoramos la interacción entre las diferentes variables que mostraron una significativa relación con el riesgo y la supervivencia, y construimos un algoritmo predictivo mediante un modelo de Cox. En todos los casos, se ha aplicado el test de Wald y el test de la razón de verosimilitud para analizar la bondad del ajuste de modelos, considerándose como significativos los *p-valores* menores que 0,05.

## **IV.- RESULTADOS**

### **4.1.- Características clinicopatológicas generales**

Las características clinicopatológicas generales de toda la serie se encuentran resumidas en la tabla 10. La edad media de presentación fue de 71,78 años (rango 36 a 92 años), con una mayor incidencia en varones (57,6%) que en mujeres (42,4%). El tiempo de seguimiento medio fue de 43,32 meses, y la mitad de los casos fueron seguidos durante al menos 50 meses.

### **4.2.- Características clinicopatológicas de acuerdo al estadio clínico**

**El estadio clínico mostró una significativa relación con el grado de diferenciación tumoral ( $p=0,03$ ), el patrón de crecimiento en el frente invasor ( $p=0,04$ ), la presencia de invasión linfovascular y perineural ( $p=0,00$  en ambos casos), la presencia de implantes neoplásicos ( $p=0,00$ ), los niveles de CEA preoperatorios ( $p=0,00$ ) y el desarrollo de metástasis a distancia durante el seguimiento ( $p=0,00$ ) (Tabla 11). Por el contrario, la edad, el sexo, la localización del tumor, la pérdida de expresión de proteínas reparadoras de DNA, así como el índice mitótico y apoptótico tumoral (evaluados en el centro del tumor) no mostraron una asociación significativa con el estadio clínico.**

<b>Tabla 10: Características clinicopatológicas generales. N= 125.</b>		
<b>Edad (años)</b>		
Media (rango)	71,78 (36-92)	
<b>Sexo, n (%)</b>		
Mujeres	53	(42,4%)
Varones	72	(57,6%)
<b>Localización, n (%)</b>		
Colon derecho	51	(40,8%)
Transverso	6	(4,8%)
Colon izquierdo	68	(54,4%)
<b>Grado histológico, n (%)</b>		
Bajo	98	(78,4%)
Alto	27	(21,6%)
<b>Estadio, n (%)</b>		
I	18	(14,4%)
II	46	(36,8%)
III	44	(35,2%)
IV	17	(13,6%)
<b>T, n (%)</b>		
T1	5	(4%)
T2	20	(16%)
T3	59	(47,2%)
T4	41	(32,8%)
<b>N, n (%)</b>		
N0	70	(56%)
N1	36	(28,8%)
N2	19	(15,2%)
<b>M, n (%)</b>		
M0	113	(90,4%)
M1-M2	17	(13,6%)
<b>Implantes, n (%)</b>		
No	113	(90,4%)
Si	12	(9,6%)
<b>Invasión linfovascular, n (%)</b>		
No	83	(66,4%)
Si	42	(33,6%)
<b>Invasión perineural, n (%)</b>		
No	96	(76,8%)
Si	29	(23,2%)
<b>MT a distancia durante el seguimiento</b>		
No	93	(86,12%)
Si	15	(13,88%)

<b>Tabla 11: Características clinicopatológicas de acuerdo el estadio clínico.</b>					
	<b>I</b> n=18 (14,4%)	<b>II</b> n=46 (36,8%)	<b>III</b> n=44(35,2%)	<b>IV</b> n=17(13,6%)	<b>p</b> <i>valor</i>
<b>Edad</b>					
Media	71,16(+/-11,32)	72,71(+/-12,67)	72,09(+/-9,99)	69,11(+/-8,57)	0,32
<b>Sexo, n (%)</b>					
Mujer	9 (50%)	20 (43,48%)	19 (43,18%)	5 (29,41%)	0,65
Varon	9 (50%)	26 (56,52%)	25 (56,82%)	12 (70,59%)	
<b>Localización, n (%)</b>					
Colon derecho	5 (27,78%)	20 (43,48%)	9 (20,45%)	10 (58,82%)	0,06
Transverso	3 (16,67%)	4 (8,70%)	10 (22,73%)	2 (11,76%)	
Colon izquierdo	10 (55,56%)	22 (47,83%)	25 (56,82%)	5 (29,41%)	
<b>Grado, n (%)</b>					
Bajo	16 (88,89%)	39 (84,78%)	34 (77,27%)	9 (52,94%)	0,03
Alto	2 (11,11%)	7 (15,22%)	10 (22,73%)	2 (47,06%)	
<b>Patrón de invasión, n (%)</b>					
Infiltrativo	7 (38,89%)	31 (67,39%)	34 (77,27%)	15 (88,24%)	0,04
Expansivo	7 (38,89%)	9 (19,57%)	5 (11,36%)	11,76(11,76%)	
Mal definido	4 (22,22%)	6 (13,04%)	3 (11,36%)	0	
<b>Mt a distancia durante el seguimiento, n (%)</b>					
No	16 (94,12%)	44 (95,65%)	29 (70,73%)	NA	0,00
Si	1 (5,88%)	2 (4,35%)	12 (29,27%)		
<b>Invasión linfovascular, n (%)</b>					
No	17 (94,44%)	39 (84,78%)	21 (47,73%)	6 (35,29%)	0,00
Si	1 (5,56%)	7 (15,22%)	23 (52,27%)	11 (64,71%)	
<b>Invasión perineural, n (%)</b>					
No	18 (100%)	43 (93,48%)	27 (61,36%)	8 (47,06%)	0,00
Si	0	3 (6,52%)	17 (38,64%)	9 (52,94%)	
<b>Pérdida de proteínas, n (%)</b>					
No	16 (94,12%)	44 (95,65%)	41 (95,35%)	17 (100%)	0,82
Si	1 (5,88%)	2 (4,35%)	2 (4,56%)	0	
<b>Implantes, n (%)</b>					
No	18 (100%)	46 (100%)	36 (81,82%)	13 (76,47%)	0,00
Si	0	0	8 (18,18%)	4 (23,53%)	
<b>Índice mitótico</b>					
Media	28,05(+/-16,62)	25,64(+/-14,49)	26,09(+/-13,32)	23,64(+/-15,59)	0,65
<b>Índice apoptótico</b>					
Media	26,82(+/-18,82)	19,35(+/-14,47)	21,60(+/-14,77)	15,23(+/-10,62)	0,07
<b>CEA</b>					
Media	3 (+/-2,09)	6,86(+/-10,84)	6,42 (+/-8,98)	9,23(+/-6,39)	0,00

### 4.3.- Expresión de miR200, ZEB y PD-L1 en el frente invasor vs el centro del tumor

El nivel medio de expresión de miR200a, miR200b, miR200c, *ZEB1*, *ZEB2* y *PDL1* mostró variaciones significativas en el frente invasor con respecto al centro tumoral (Tabla 12). **Los niveles de miR200a, miR200b y miR200c resultaron considerablemente inferiores en el frente invasor ( $p < 0,00$  en todos los casos). La expresión de *ZEB1*, *ZEB2* y *PD-L1* fue muy superior en el frente invasor con respecto al centro del tumor (*ZEB1*:  $p = 0,00$ , *ZEB2*:  $P = 0,02$  y *PD-L1*:  $p = 0,01$ ).** (Figuras 6, 7 y 8)

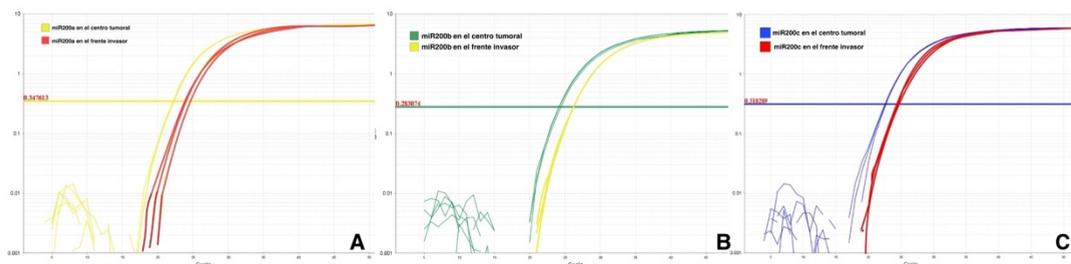


Figura 6: Curvas de amplificación de miR200a (A), miR200b (B) y miR200c (C) tanto en el frente invasor como en el centro del tumor en el caso N°18.

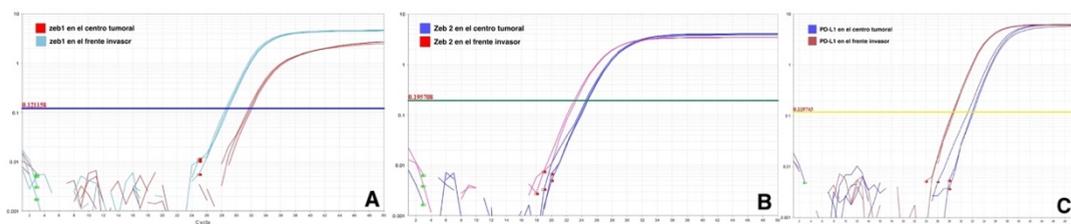


Figura 7. Curvas de amplificación de *ZEB1* (A), *ZEB2* (B) y *PD-L1* (C) tanto en el frente invasor como en el centro del tumor en el caso N°24.

<b>Tabla 12: Expresión de miR200, ZEB y PDL-1 en frente invasor y en el centro del tumor.</b>			
	<b>Frente invasor</b>	<b>Centro tumoral</b>	<b>p valor</b>
<b>miR200a</b>			
Media	1,814 (+/-2,501)	4,093 (+/-7,115)	<b>0,00</b>
Rango	0,012-11,806	0,000013-56,344	
P25	0,3161	0,616	
P50	0,9078	1,883	
P75	2,141	4,640	
<b>miR200b</b>			
Media	1,325 (+/-2,872)	4,413 (+/-12,247)	<b>0,00</b>
Rango	0,014-23,255	0,034-95,505	
P25	0,327	0,694	
P50	0,604	1,199	
P75	1,259	2,655	
<b>miR200c</b>			
Media	1,745 (+/-2,394)	5,472 (+/-15,672)	<b>0,00</b>
Rango	0,00000023-17,905	0,00000041	
P25	0,495	0,875	
P50	0,999	1,924	
P75	1,793	3,904	
<b>ZEB1</b>			
Media	316,763 (+/-786,552)	12,744 (+/-40,180)	<b>0,00</b>
Rango	0,00000705-3565,949	5,047711e-10-297,968	
P25	0,033	0,0039	
P50	1,792	0,204	
P75	89,145	4,555	
<b>ZEB2</b>			
Media	53,172 (+/-134,388)	20,803 (+/-48,719)	<b>0,02</b>
Rango	0,000-778,796	0,000-299,779	
P25	0,026	0,013	
P50	1,164	0,614	
P75	32,161	9,640	
<b>PD-L1</b>			
Media	86,058 (+/-208,904)	24,647 (+/-59,052)	<b>0,01</b>
Rango	0,000-1197,12	0,000-306,488	
P25	0,0446	0,0282	
P50	1,149	0,839	
P75	35,330	14,644	

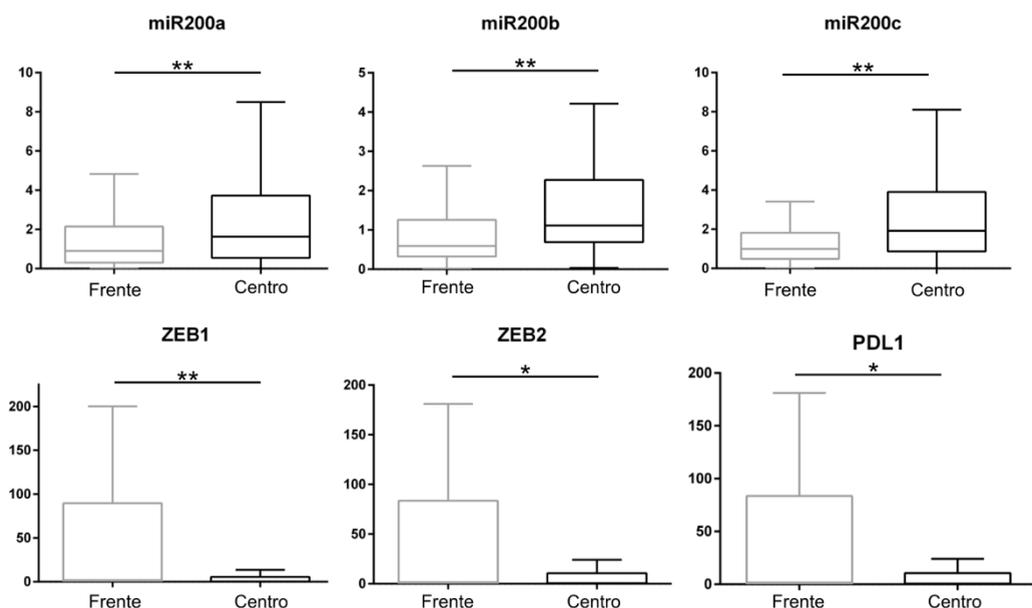


Figura 8. Observamos una significativa reducción de la expresión de miR200a, miR200b y miR200c en el frente invasor con respecto al centro del tumor ( $p=0,00$  en todos los casos). Por el contrario, la expresión de *ZEB1*, *ZEB2* y *PD-L1* fue muy superior en frente invasor con respecto al centro del tumor ( $p=0,00$ ,  $p=0,02$  y  $p=0,01$  respectivamente).

#### 4.3.1.- Correlación entre la expresión de PD-L1 y la expresión de miR200 y *ZEB* en el frente invasor y en el centro tumoral

La expresión de *PD-L1* mostró una asociación significativa inversa con la expresión de miR200a y miR200c, y de forma directa con la expresión de *ZEB1* y *ZEB2*. Dicha asociación se reprodujo tanto en el frente invasor como en el centro tumoral (Figura 9 y Tablas 13 y 14). La expresión de miR200b no se correlacionó de forma significativa con la expresión de *PD-L1*.

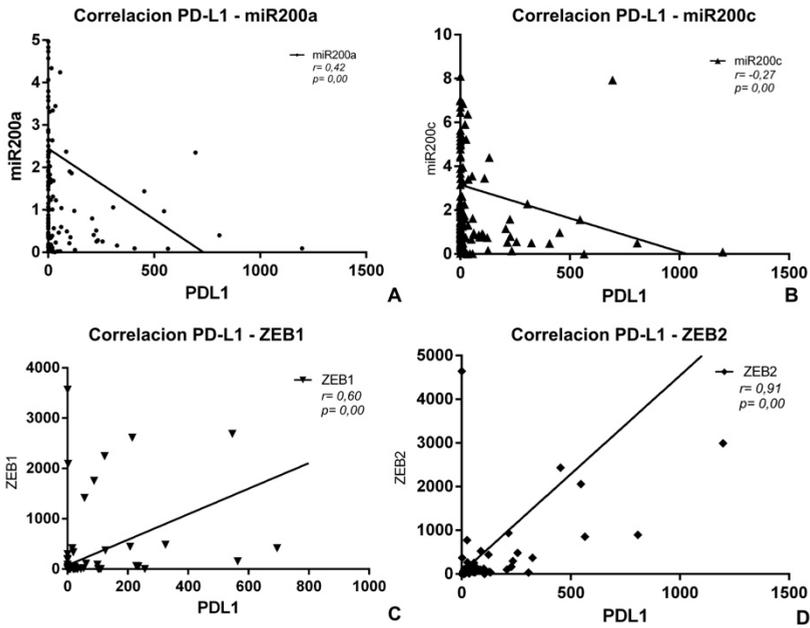


Figura 9: Correlación entre la expresión de *PD-L1* y la expresión de miR200a (A), miR200c (B), *ZEB1* (C) y *ZEB2* (D) en el frente invasor ( $r = Rho$  de Spearman).

Tabla 13: Correlación entre la expresión de <i>PD-L1</i> y la expresión de miR200 y <i>ZEB</i> en el frente invasor				
	Infra expresión de <i>PD-L1</i>	Sobreexpresión de <i>PD-L1</i>	Correlación (Rho Spearman)	<i>p</i> valor
<b>miR200a</b>				
Media	1,1890	0,378	<b>-0,42</b>	<b>0,00</b>
<b>miR200b</b>				
Media	0,589	0,684	-0,05	0,51
<b>miR200c</b>				
Media	1,112	0,654	<b>-0,27</b>	<b>0,00</b>
<b>ZEB1</b>				
Media	0,548	444,704	<b>0,69</b>	<b>0,00</b>
<b>ZEB2</b>				
Media	1,147	689,937	<b>0,91</b>	<b>0,00</b>

<b>Tabla 14: Correlación entre la expresión de PD-L1 (alta vs baja) y la expresión de miR200 y ZEB en el centro del tumor</b>				
	<b>Infra expresión de PD-L1</b>	<b>Sobreexpresión de PD-L1</b>	<b>Correlación (Rho Spearman)</b>	<b>p valor</b>
<b>miR200a</b>				
Media	2,135330	1,904838	<b>-0,29</b>	<b>0,00</b>
<b>miR200b</b>				
Media	1,233287	1,114586	<b>-0,03</b>	<b>0,77</b>
<b>miR200c</b>				
Media	2,274139	1,436069	<b>-0,26</b>	<b>0,02</b>
<b>ZEB1</b>				
Media	0,03259416	0,91830990	<b>0,72</b>	<b>0,00</b>
<b>ZEB2</b>				
Media	0,249	2,143	<b>0,93</b>	<b>0,00</b>

#### **4.4.- Hallazgos en función del patrón de invasión**

23 casos (18,4%), mostraron patrón de invasión expansivo y 87 casos (69,6%) patrón de crecimiento infiltrativo en el frente tumoral. En 15 casos (12%) no fue posible valorar el patrón de crecimiento en el frente invasor ya que el mismo se encontraba oscurecido por un denso infiltrado inflamatorio. **Los casos con patrón infiltrativo se asociaron de forma significativa a una mayor profundidad de invasión en la pared intestinal (pT), ( $p=0,00$ ); un mayor número de ganglios linfáticos afectados (pN), ( $p=0,00$ ); y estadios patológicos más avanzados ( $p=0,04$ ). Otros factores de mal pronóstico como son la presencia de invasión linfovascular y de invasión perineural, también fueron más frecuentes en el grupo de tumores con crecimiento infiltrativo ( $p=0,00$  y  $0,02$  respectivamente). El desarrollo de metástasis durante el seguimiento fue un evento más frecuente en las lesiones con patrón infiltrativo ( $p=0,05$ ). La localización del tumor, el grado de diferenciación, la presencia de implantes neoplásicos y el nivel de CEA al**

diagnóstico, no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 15).

**Observamos un mayor índice apoptótico en las lesiones con crecimiento infiltrativo ( $p=0,02$ ).** La actividad mitótica no mostro mostró diferencias significativas entre ambos grupos.

**Los casos con patrón de crecimiento infiltrativo presentaron niveles de expresión de miR200b y miR200c significativamente inferiores con respecto a los casos con patrón expansivo ( $p=0,02$  y  $0,03$  respectivamente) en las muestras tomadas del centro tumoral. En el frente invasor observamos niveles de expresión de *ZEB1* y *ZEB2* superiores con respecto a la misma zona en los tumores con patrón de crecimiento expansivo ( $p=0,03$  y  $0,01$  respectivamente) (Tabla 16).**

<b>Tabla 15: características de los casos según el patrón de invasión.</b>			
	<b>Expansivo n= 23 (18,4%)</b>	<b>Infiltrativo n=87 (69,6%)</b>	<i>p valor</i>
<b>Localización, n (%)</b>			
Colon derecho	8 (34,78%)	31 (35,63%)	0,07
Transverso	5 (21,74%)	13 (14,94%)	
Colon izquierdo	10 (43,48%)	43 (49,43%)	
<b>Grado, n (%)</b>			
Bajo	21 (91,3%)	64 (73,56%)	0,13
Alto	2 (8,7%)	23 (26,44%)	
<b>Estadio, n (%)</b>			
I	7 (30,43%)	7 (8,05%)	0,04
II	9 (39,13%)	31 (35,63%)	
III	5 (21,74%)	34 (39,08%)	
IV	2 (8,7%)	15 (17,24%)	
<b>T, n (%)</b>			
T1	7 (30,43%)	0 (0%)	0,00
T2	9 (39,13%)	9 (10,34%)	
T3	5 (21,74%)	39 (44,83%)	
T4	2 (8,7%)	39 (44,83%)	
<b>N, n (%)</b>			
N0	19 (82,61%)	42 (48,28%)	0,03
N1	3 (13,04%)	28 (32,18%)	
N2	1 (4,35%)	2 (19,54%)	
<b>N de ganglios afectados</b>			
Media	0,52 (+/-1,42)	2,13 (+/-5,51)	0,00
<b>M, n (%)</b>			
M0	21 (86,18%)	71 (82,56%)	0,15
M1-M2	2 (13,82%)	15 (17,44%)	
<b>Implantes, n (%)</b>			
No	113 (91,3%)	78 (89,66%)	0,37
Si	12 (8,7%)	9 (10,34%)	
<b>Invasión linfovascular, n (%)</b>			
No	21 (91,3%)	50 (57,47%)	0,00
Si	2 (8,7%)	37 (42,53%)	
<b>Invasión perineural, n (%)</b>			
No	21 (91,3%)	61 (70,11%)	0,02
Si	2 (8,7%)	26 (29,89%)	
<b>Indice apoptótico</b>			
Media	27,13 (+/- 17,85)	18,37 (+/-12,65)	0,02
<b>Indice mitótico</b>			
Media	27,13 (+/-17,85)	18,37 (+/-12,65)	0,25
<b>MT a distancia, n (%)</b>			
No	21 (100%)	73 (83,91%)	0,05
Si	0	14 (16,09%)	

<b>Tabla 16: Expresión de miR200, ZEB y PD-L1 tanto en el frente invasor como en el centro del tumor en relación al patrón de invasión.</b>			
	<b>Expansivo</b>	<b>Infiltrativo</b>	<b>P valor</b>
<b>miR200a frente invasor</b>			
Media	2,405 (+/- 3,410)	1,594 (+/-2,189)	0,68
<b>miR200a centro</b>			
Media	5,681 (+/-6,780)	3,801 (+/-7,552)	0,07
<b>miR200b frente invasor</b>			
Media	1,801 (+/-3,924)	1,265 (+/-2,781)	0,98
<b>miR200b centro</b>			
Media	6,661 (+/-19,911)	4,283 (+/-10,728)	<b>0,02</b>
<b>miR200c frente invasor</b>			
Media	2,227 (+/-3,824)	1,597 (+/-1,893)	0,85
<b>miR200c centro</b>			
Media	9,888 (+/-30,692)	4,776 (+/-10,494)	<b>0,03</b>
<b>ZEB1 frente invasor</b>			
Media	77,699 (+/-168,16)	401,88 (+/-899,24)	<b>0,03</b>
<b>ZEB1 centro</b>			
Media	4,114 (+/-8,285)	8,826 (+/-20,942)	0,41
<b>ZEB2 frente invasor</b>			
Media	36,859 (+/-142,068)	60,525 (+/-139,921)	<b>0,01</b>
<b>ZEB2 centro</b>			
Media	11,784 (+/-28,250)	25,749 (+/-56,155)	0,32
<b>PD-L1 frente invasor</b>			
Media	138,66 (+/-352,90)	82,337 (+/-184,183)	0,15
<b>PD-L1 centro</b>			
Media	41,364 (+/-89,849)	22,317 (+/-54,058)	0,73

#### **4.5- Desdiferenciación tumoral focal (DTF)**

En el estudio de las preparaciones teñidas con HE, 15 casos (12% de la población total) carecían completamente de estructuras compatibles con DTF. De estos, 14 mostraron un patrón de crecimiento expansivo (lo que representa el 60% de los casos con patrón expansivo), y uno mostraba un patrón de invasión mal definido con un denso infiltrado inflamatorio en el frente tumoral. En 7 (46%) de dichos casos con ausencia de DTF, fue posible identificar

células sueltas y pequeños nidos tumorales en el frente invasor por medio del estudio inmunohistoquímico para CKAE1/AE3.

La proporción de casos clasificados como de bajo, intermedio y alto grado mediante los métodos 1 y 3 resultó similar (29,5%, 32% y 38,5% con el método 1, y 31%, 37% y 32% con el método 3 respectivamente). Sin embargo, solo 4% (n=5) de los casos fue clasificado dentro del grupo de alto grado al aplicar el método 2 para la valoración de DTF.

**El grado de DTF, independientemente del método utilizado para su valoración, se correlacionó constantemente y de forma significativa con el tamaño tumoral (pT), el número de ganglios linfáticos afectados y la presencia de invasión linfovascular (Tablas 16, 17 y 18). La clasificación obtenida mediante el método 3 mostró una relación significativa con los niveles de CEA preoperatorios y el desarrollo de MT a distancia, ( $p=0,05$  y  $p=0,01$  respectivamente) relación no obtenida con los otros dos métodos.**

La actividad mitótica y apoptótica en el centro de la lesión, así como la pérdida de expresión de proteínas reparadoras del DNA, no mostraron relación con el grado de DTF con ninguno de los métodos utilizados para su valoración.

<b>Tabla 16: Características de acuerdo al grado de DTF evaluado mediante el método 1.</b>				
	<b>Bajo n=36 (29,5%)</b>	<b>Intermedio N=39 (32%)</b>	<b>Alto n=47 (38,5%)</b>	<b>P valor</b>
<b>Localización, n (%)</b>				
Derecho	12 (33,33%)	13 (33,33%)	18 (38,30%)	0,81
Transverso	6 (16,67%)	4 (10,26%)	8 (17,02%)	
Izquierdo	18 (50%)	22 (56,41%)	21 (44,68%)	
<b>Grado, n (%)</b>				
Bajo	33 (91,67%)	33 (84,62%)	32 (68,09%)	0,01
Alto	3 (8,33%)	6 (15,38%)	15 (31,91%)	
<b>Estadio, n (%)</b>				
I	10 (27,78%)	4 (10,26%)	3 (6,38%)	0,03
II	15 (41,67%)	16 (41,03%)	14 (29,79%)	
III	9 (25%)	13 (33,33%)	21 (44,78%)	
IV	2 (5,56%)	6 (15,38%)	9 (19,15%)	
<b>T, n (%)</b>				
T1	5 (13,89%)	0 (0%)	0 (0%)	0,00
T2	10 (27,78%)	5 (12,82%)	4 (8,51%)	
T3	20 (55,56%)	21 (53,85%)	17 (36,17%)	
T4	1 (2,78%)	13 (33,33%)	26 (55,32%)	
<b>N, n (%)</b>				
N0	28 (77,78%)	22 (56,41%)	19 (40,43%)	0,00
N1	8 (22,22%)	7 (17,95%)	20 (42,55%)	
N2	0	10 (25,64%)	8 (17,02%)	
<b>M, n (%)</b>				
M0	33 (94,29%)	33 (84,62%)	37 (80,43%)	0,20
M1-M2	2 (5,71%)	6 (15,38%)	9 (19,57%)	
<b>N, de ganglios afectados</b>				
Media	0,25 (+/-0,55)	2,69 (+/-5,68)	1,89 (+/-3,42)	0,00
<b>Invasión linfovascular, n (%)</b>				
No	33 (91,67%)	23 (58,93%)	24 (51,06%)	0,00
Si	3 (8,33%)	16 (41,03%)	23 (48,94%)	
<b>Invasión perineural, n (%)</b>				
No	35 (97,22%)	37 (94,87%)	31 (65,96%)	0,00
Si	1 (2,78%)	2 (5,13%)	16 (34,04%)	
<b>Implantes, n (%)</b>				
No	33 (91,67%)	27 (69,23%)	40 (85,11%)	0,29
Si	3 (8,33%)	12 (30,77%)	7 (14,89%)	
<b>Pérdida de proteínas, n (%)</b>				
No	34 (97,14%)	36 (94,74%)	46 (97,87%)	0,71
Si	1 (2,86%)	2 (5,26%)	1 (2,13%)	
<b>CEA</b>				
Media	8,18 (+/-11,76)	207,52 (+/-1174)	31,29 (+/-108,05)	0,46
<b>MT a distancia, n (%)</b>				
No	30 (93,75%)	27 (81,82%)	29 (80,56%)	0,25
Si	2 (6,25%)	6 (18,18%)	7 (19,44%)	

<b>Tabla 17: Características de acuerdo al grado de DTF evaluado mediante el método 2.</b>				
	<b>Bajo n=81 (30%)</b>	<b>Intermedio N=36 (66%)</b>	<b>Alto n=5 (4%)</b>	<b>P valor</b>
<b>Localización, n (%)</b>				
Derecho	25 (10,86%)	17 (47,22%)	1 (20%)	0,34
Transverso	11 (13,58%)	6 (16,67%)	1 (20%)	
Izquierdo	45 (55,56%)	13 (36,11%)	3 (60%)	
<b>Grado, n (%)</b>				
Bajo	71 (87,65%)	25 (69,44%)	2 (40%)	0,00
Alto	10 (12,35%)	11 (30,56%)	3 (60%)	
<b>Estadio, n (%)</b>				
I	14 (17,28%)	3 (8,33%)	0	0,12
II	34 (41,98%)	10 (27,78%)	1 (20%)	
III	26 (36,10%)	14 (38,89%)	3 (60%)	
IV	7 (8,64%)	9 (25%)	1 (20%)	
<b>T, n (%)</b>				
T1	5 (6,17%)	0	0	0,00
T2	15 (18,52%)	4 (11,11%)	0	
T3	45 (55,56%)	10 (27,78%)	3 (60%)	
T4	16 (19,75%)	22 (61,11%)	2 (40%)	
<b>N, n (%)</b>				
N0	52 (64,20%)	15 (41,67%)	2 (40%)	0,06
N1	20 (24,69%)	14 (38,89%)	2 (40%)	
N2	9 (11,11%)	7 (19,44%)	1 (20%)	
<b>M, n (%)</b>				
M0	73 (91,25%)	26 (74,29%)	4 (80%)	0,05
M1-M2	7 (8,75%)	9 (25,71%)	1 (20%)	
<b>N, de ganglios afectos</b>				
Media	1,07(+/-2,26)	2,44(+/-5,56)	5,6(+/-8,20)	0,01
<b>Invasión linfovascular, n (%)</b>				
No	59 (72,84%)	19 (52,78%)	2 (40%)	0,05
Si	22 (27,16%)	17 (47,22%)	3 (60%)	
<b>Invasión perineural, n (%)</b>				
No	67 (82,64%)	24 (66,67%)	2 (40%)	0,02
Si	14 (17,28%)	12 (33,33%)	3 (60%)	
<b>Implantes, n (%)</b>				
No	74 (91,36%)	31 (86,11%)	5 (100%)	0,51
Si	7 (8,64%)	5 (13,89%)	0	
<b>Pérdida de proteínas, n (%)</b>				
No	76 (96,20%)	35 (97,22%)	5 (100%)	0,87
Si	3 (3,8%)	1 (2,78%)	0	
<b>CEA</b>				
Media	3,36 (+/- 2,46)	39,50(+/-123)	102,30(+/-806)	0,59
<b>MT a distancia, n (%)</b>				
No	64 (88,89%)	20 (80%)	2 (50%)	0,07
Si	8 (11,11%)	5 (20%)	2 (50%)	

<b>Tabla 18: Características de acuerdo al grado de DTF evaluado mediante el método 3.</b>				
	<b>Bajos n=38 (31%)</b>	<b>Intermedios n=45 (37%)</b>	<b>Altos n=39 (32%)</b>	<b>P valor</b>
<b>Localización, n (%)</b>				
Derecho	10 (26,32%)	15 (33,33%)	18 (46,15%)	0,48
Transverso	6 (15,79%)	7 (15,56%)	5 (12,82%)	
Izquierdo	22 (57,89%)	23 (51,11%)	16 (41,03%)	
<b>Grado, n (%)</b>				
Bajo	34 (89,47%)	35 (77,78%)	29 (74,36%)	0,21
Alto	4 (10,53%)	10 (22,22%)	10 (25,64%)	
<b>Estadio, n (%)</b>				
I	7 (18,42%)	7 (15,56%)	3 (7,69%)	0,23
II	19 (50%)	13 (28,89%)	13 (33,33%)	
III	9 (23,68%)	18 (40%)	16 (41,03%)	
IV	3 (7,89%)	4 (15,56%)	7 (17,95%)	
<b>T, n (%)</b>				
T1	4 (10,53%)	1 (2,22%)	0	0,01
T2	8 (21,05%)	8 (17,78%)	3 (7,69%)	
T3	21 (55,26%)	20 (44,44%)	17 (43,59%)	
T4	5 (13,16%)	16 (35,56%)	19 (48,72%)	
<b>N, n (%)</b>				
N0	28 (73,68%)	23 (51,11%)	17 (43,59%)	0,06
N1	7 (18,42%)	16 (35,56%)	13 (33,33%)	
N2	3 (7,89%)	6 (13,33%)	9 (23,08%)	
<b>M, n (%)</b>				
M0	34 (91,89%)	37 (84,09%)	32 (82,05%)	0,43
M1-M2	3 (8,11%)	7 (15,91%)	7 (17,95%)	
<b>N, de ganglios afectos</b>				
Media	0,63(+/-1,85)	2,04(+/-4,98)	2,23(+/-4,02)	0,00
<b>Invasión linfovascular, n (%)</b>				
No	29 (76,32%)	31 (68,89%)	20 (51,28%)	0,05
Si	9 (23,68%)	14 (31,11%)	19 (48,72%)	
<b>Invasión perineural, n (%)</b>				
No	32 (84,21%)	36 (80%)	25 (64,1%)	0,08
Si	6 (15,79%)	9 (20%)	14 (35,9%)	
<b>Implantes, n (%)</b>				
No	34 (89,47%)	41 (91,11%)	35 (89,74%)	0,96
Si	4 (10,53%)	4 (8,89%)	4 (10,26%)	
<b>Pérdida de proteínas, n (%)</b>				
No	34 (91,89%)	44 (97,78%)	38 (100%)	0,12
Si	3 (8,11%)	1 (2,22%)	0	
<b>CEA</b>				
Media	4,32 (+/-5,45)	12,22(+/-20,18)	193,50(+/-1058)	0,05
<b>MT a distancia, n (%)</b>				
No	33 (100%)	28 (77,78%)	25 (78,12%)	0,01
Si	0	8 (22,22%)	7 (21,88%)	

#### 4.5.1- Expresión de miRNAs y mRNAs de acuerdo al grado de DTF

En los casos con mayor grado de DTF evaluada mediante los métodos 1 y 3, observamos una reducción significativa de los niveles de expresión de miR200c en el centro del tumor con respecto a los casos de grado bajo e intermedio (método 1:  $p=0,02$ , método 3:  $p=0,04$ ). De forma similar, la expresión en el centro del tumor de miR200b mostró una reducción significativa en los casos con alto grado de DTF en relación con los de grado bajo e intermedio clasificados según el método 3 ( $p=0,00$ ) (Tablas 14, 15 y 16).

A pesar de que los niveles de expresión de *PD-L1* no se correlacionaron de forma directa con el grado de DTF, al analizar las diferencias de expresión en el centro del tumor con respecto al frente invasor, **observamos que en las lesiones con alto grado de DTF, el incremento de expresión de *PD-L1* en el frente invasor fue muy superior con respecto al incremento observado en las lesiones con DTF de grado bajo e intermedio ( $p=0,03$ )** (Figura 10). **Esta relación se mantuvo con el mismo nivel de significancia al excluir del análisis los casos con IMS.** Con la finalidad de comprobar los resultados obtenidos, realizamos el estudio de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en 10 casos seleccionados de CCR: 5 con DTF de alto grado y 5 con DTF de bajo grado (ver anexo 1).

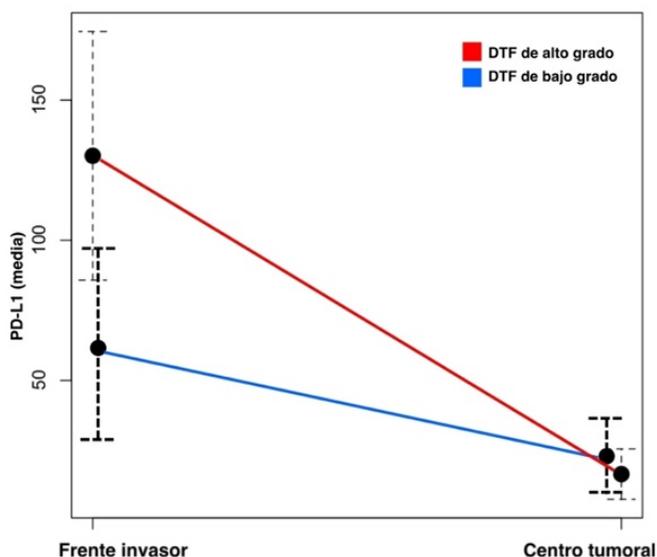


Figura 10: Expresión de *PD-L1* en el frente invasor y en el centro tumoral de acuerdo al grado de DTF evaluado mediante el método 1. En los casos con DTF de alto grado el incremento de *PD-L1* en el frente invasor fue muy superior con respecto a los casos con DTF de grado bajo e intermedio.

Tabla 14: Expresión de <i>miR200</i> , <i>ZEB</i> y <i>PD-L1</i> tanto en el frente invasor como en el centro del tumor, en relación al grado de DTF evaluado mediante el método 1.				
	Bajo	Intermedio	Alto	<i>P</i> valor
<b>miR200a frente invasor</b>				
Media	2,38 (+/-3,09)	1,67 (+/-2,34)	1,52 (+/-2,08)	0,21
<b>miR200a centro</b>				
Media	5,12 (+/-6,21)	2,73 (+/-4,83)	4,61 (+/-9,29)	0,25
<b>miR200b frente invasor</b>				
Media	0,88 (+/-1,04)	1,65 (+/-4,01)	1,07 (+/-1,14)	0,40
<b>miR200b centro</b>				
Media	4,52 (+/- 15,90)	5,20 (+/- 11,56)	3,85 (+/- 10,10)	0,12
<b>miR200c frente invasor</b>				
Media	2,05 (+/- 3,28)	1,66 (+/- 1,77)	1,63 (+/-1,99)	0,06
<b>miR200c centro</b>				
Media	7,29 (+/-24,40)	6,63 (+/-14,77)	3,17 (+/-4,05)	<b>0,02</b>
<b>ZEB1 frente invasor</b>				
Media	81,87 (+/-170,57)	302,54 (+/-799,67)	507,12 (+/-97,51)	0,08

<b>ZEB1 centro</b>				
Media	22,56 (+/- 69,68)	14,91 (+/-28,85)	4,13 (+/-7,84)	0,29
<b>ZEB2 frente invasor</b>				
Media	39,99 (+/-123,19)	69,60 (+/- 155,89)	47,84 (+/-125,18)	0,29
<b>ZEB2 centro</b>				
Media	9,71 (+/-23,70)	37,71 (+/-66,70)	14,83 (+/- 42,01)	0,60
<b>PDL1 frente invasor</b>				
Media	96,26 (+/-262,12)	26,87 (+/-50,94)	130,14 (+/238,81)	0,12
<b>PDL1 centro</b>				
Media	31,07 (+/-71,30)	29,98 (+/-63,18)	16,57 (+/-46,60)	0,47

<b>Tabla 15: Expresión de miR200, ZEB y PD-L1 tanto en el frente invasor como en el centro del tumor, en relación al grado de DTF evaluado mediante el método 2.</b>				
	<b>Bajo</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Alto</b>	<b>P valor</b>
<b>miR200a frente invasor</b>				
Media	1,08 (+/-0,99)	0,83 (+/-0,78)	1,16 (+/- 0,84)	0,60
<b>miR200a centro</b>				
Media	1,83 (+/-1,63)	1,72 (+/-1,64)	0,63 (+/-0,85)	0,28
<b>miR200b frente invasor</b>				
Media	0,90 (+/-0,82)	0,81 (+/-0,71)	0,63 (+/-0,43)	0,90
<b>miR200b centro</b>				
Media	1,47 (+/-1,24)	1,18 (+/- 0,84)	1,66 (+/-1,26)	0,73
<b>miR200c frente invasor</b>				
Media	1,11 (+/-0,89)	1,05 (+/-0,85)	1,64 (+/-1,44)	0,75
<b>miR200c centro</b>				
Media	1,91 (+/-1,50)	2,05 (+/- 1,56)	1,28 (+/-2,08)	0,48
<b>ZEB1 frente invasor</b>				
Media	0,69 (+/-1,25)	0,80 (+/-1,23)	-	0,60
<b>ZEB1 centro</b>				
Media	0,64 (+/-1,40)	0,97 (+/-1,88)	0,06 (+/- 0)	0,98
<b>ZEB2 frente invasor</b>				
Media	127,01 (+/437,33)	274,47 (+/583,17)	3,90 (+/-5,71)	0,68
<b>ZEB2 centro</b>				
Media	1,22 (+/-2,28)	1,12 (+/-2,04)	2,09 (+/-2,96)	0,82
<b>PDL1 frente invasor</b>				
Media	2,15 (+/-3,95)	1,37 (+/-3,78)	0,53 (+/-0,41)	0,79
<b>PDL1 centro</b>				
Media	1,25 (+/-2,37)	1,23 (+/-2,66)	1,30 (+/- 0)	0,59

<b>Tabla 16: Expresión de miR200, ZEB y PD-L1 tanto en el frente invasor como en el centro del tumor, en relación al grado de DTF evaluado mediante el método 3.</b>				
	<b>Bajo</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Alto</b>	<b>p valor</b>
<b>miR200a frente invasor</b>				
Media	0,92 (+/- 0,97)	1,11 (+/-0,97)	0,97 (+/- 0,85)	0,43
<b>miR200a centro</b>				
Media	1,80 (+/-1,48)	2,07 (+/-1,86)	1,39 (+/- 1,40)	0,31
<b>miR200b frente invasor</b>				
Media	1,00 (+/-0,90)	0,96 (+/-0,84)	0,60 (+/- 0,46)	0,17
<b>miR200b centro</b>				
Media	1,87 (+/- 1,35)	1,09 (+/-1,00)	1,24 (+/-0,87)	<b>0,00</b>
<b>miR200c frente invasor</b>				
Media	1,08 (+/-0,97)	1,00 (+/-0,63)	1,25 (+/- 1,07)	0,76
<b>miR200c centro</b>				
Media	2,37 (+/-1,46)	1,87 (+/- 1,69)	1,58 (+/- 1,31)	<b>0,04</b>
<b>ZEB1 frente invasor</b>				
Media	0,47 (+/- 0,719)	0,57 (+/- 1,36)	1,02 (+/-1,43)	0,60
<b>ZEB1 centro</b>				
Media	0,74 (+/-1,83)	0,53 (+/- 1,25)	0,93 (+/- 1,69)	0,98
<b>ZEB2 frente invasor</b>				
Media	190,57 (+/-604,36)	155,61 (+/- 408,47)	155,00 (+/-432,2)	0,68
<b>ZEB2 centro</b>				
Media	1,38 (+/- 2,54)	0,74 (+/- 1,53)	1,67 (+/- 2,52)	0,82
<b>PD-L1 frente invasor</b>				
Media	2,25 (+/-3,97)	2,40 (+/-4,73)	1,05 (+/- 2,39)	0,79
<b>PD-L1 centro</b>				
Media	0,60 (+/- 1,28)	1,36 (+/-2,69)	1,44 (+/- 2,60)	0,59

#### **4.6.- Índice mitótico y apoptótico y presencia de emperipolesis en las zonas de DTF**

En el componente de DTF mas del 75% de los casos carecía por completo de actividad mitótica y apoptótica evidente tras analizar todo el frente invasor tumoral en la preparación seleccionada. En los casos que, si mostraron actividad, la misma oscilaba entre 1 y 12 mitosis en 10CGA, y entre 1 y 13 cuerpos apoptóticos en 10CGA. **Observamos un incremento**

**proporcional de la actividad mitótica y apoptótica en relación con el grado de DTF, aunque esta solo alcanzó la significancia estadística en ambos casos en los tumores evaluados mediante el método 1 (Tabla 17).**

En la evaluación de la emperipolesis en las zonas de DTF, observamos que las células ingeridas presentaban diferentes aspectos que variaban desde células intactas con núcleo evidente, hasta estructuras eosinofílicas densas, ovaladas y condensadas, sin núcleo; o en algunas ocasiones fragmentos celulares agrupados (Figura 11). En la inmunotinción para CKAE1/AE3 las imágenes de emperipolesis eran aún más evidentes y era posible observar positividad tanto en la célula ingerida como en la célula que la contenía. **La presencia de estas figuras de emperipolesis se incrementó significativamente en relación con el grado de DTF evaluado mediante los tres métodos aplicados.**

<b>Tabla 17: Índice mitótico y apoptótico y presencia de emperipolesis en las zonas de DTF de acuerdo al grado de DTF.</b>				
	<b>Bajo</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Alto</b>	<b>P valor</b>
<b>Método 1</b>				
<b>Índice mitótico</b>				
Media	0,04 (+/-0,21)	0,61 (+/- 1,96)	0,59 (+/-1,17)	<b>0,04</b>
<b>Índice apoptótico</b>				
Media	0,14 (+/-0,35)	0,56 (+/-2,12)	0,65 (+/- 1,00)	<b>0,03</b>
<b>Emperipolesis</b>				
Media	1,25 (+/-1,65)	7,02 (+/-5,16)	11,11 (+/-7,42)	<b>0,00</b>
<b>Método 2</b>				
<b>Índice mitótico</b>				
Media	0,42 (+/-1,54)	0,63 (+/- 1,29)	0,40 (+/-0,54)	<b>0,34</b>
<b>Índice apoptótico</b>				
Media	0,42 (+/-1,65)	0,63 (+/- 1,09)	1,00 (+/- 0,70)	<b>0,01</b>
<b>Emperipolesis</b>				
Media	4,95(+/-4,72)	11,61(+/-7,44)	18,75 (+/-5,18)	<b>0,04</b>
<b>Método 3</b>				
<b>Índice mitótico</b>				
Media	0,16 (+/- 0,48)	0,59 (+/- 2,01)	0,58 (+/- 0,93)	<b>0,07</b>
<b>Índice apoptótico</b>				
Media	0,33 (+/- 0,63)	0,68 (+/- 2,07)	0,46 (+/- 0,85)	<b>0,92</b>
<b>Emperipolesis</b>				
Media	2,04(+/-2,4)	7,78(+/-5,57)	10,92(+/-7,82)	<b>0,04</b>

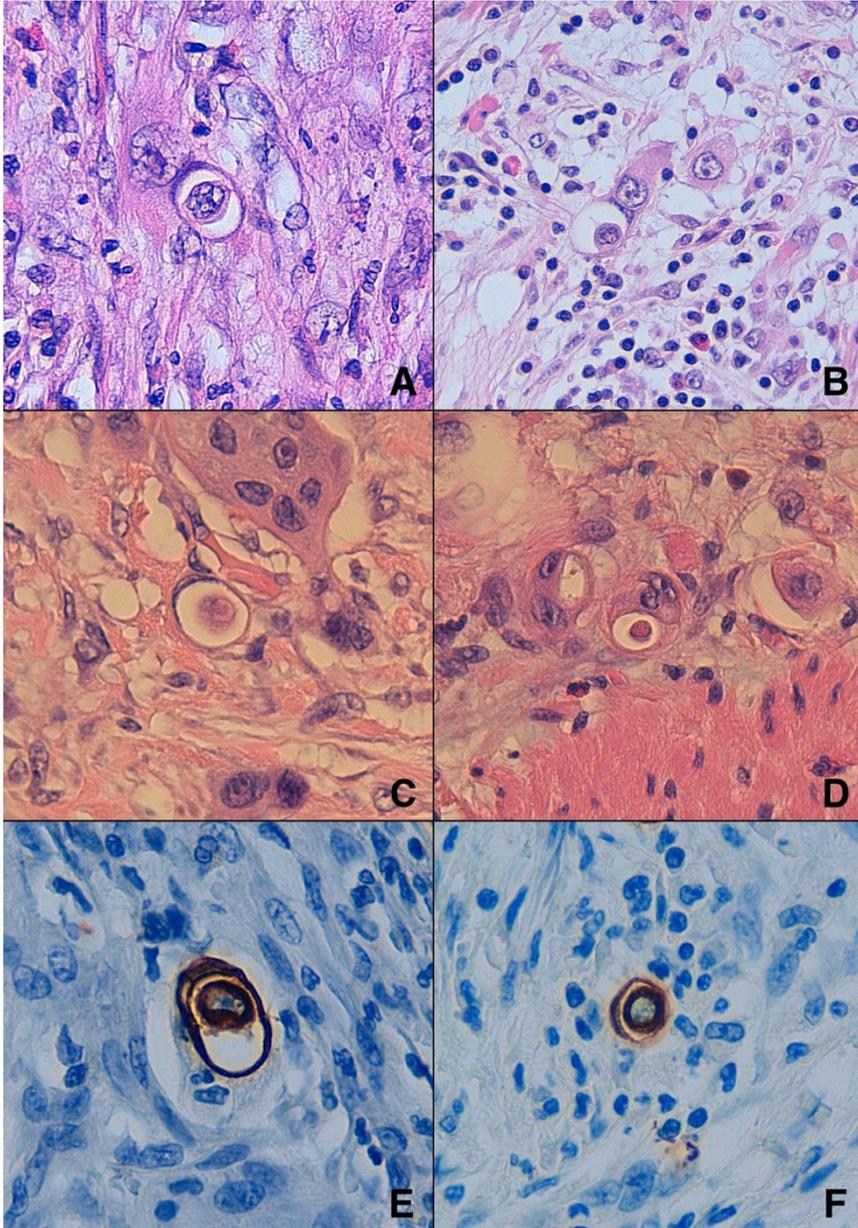


Figura 11: Imágenes de emperipolesis en las zonas de DTF. En la tinción de HE observamos una célula epitelial intacta dentro de otra, generalmente incluida en una vacuola intracitoplasmática. (A y B) En algunos casos, la célula incluida en la vacuola muestra aspecto degenerado, sin núcleo evidente (C y D). En la inmunotinción para CKAE1/AE3 las imágenes de emperipolesis son más evidentes y observamos positividad tanto en la célula ingerida como en la célula que la contiene (E y F). (A al F: 60X).

#### 4.7.- Análisis de acuerdo al grado de diferenciación histológico

El grado histológico se asoció significativamente con el estadio clínico ( $p=0,01$ ), el tamaño tumoral (pT,  $p=0,02$ ), el número de ganglios linfáticos afectos ( $p=0,00$ ), la presencia de invasión linfovascular ( $p=0,02$ ) y el desarrollo de metástasis durante el seguimiento ( $p=0,01$ ). Las lesiones con menor diferenciación histológica (tumores de alto grado) se asociaron significativamente con la pérdida de expresión de proteínas reparadoras del DNA y a la localización en colon derecho ( $p=0,00$  y  $p=0,03$ ). La actividad mitótica y apoptótica no mostró relación con el grado de diferenciación tumoral (Tabla 18).

Los niveles de expresión de miR200, *ZEB* y *PD-L1* no presentaron relación significativa con el grado de diferenciación tumoral.

<b>Tabla 18: características de los casos según el grado de diferenciación histológico.</b>			
	<b>Bajo n= 98 (78,4%)</b>	<b>Alto n=27 (21,6%)</b>	<b><i>p</i> valor</b>
<b>Localización, n (%)</b>			
Colon derecho	29 (30%)	15 (55%)	<b>0,03</b>
Transverso	15 (15%)	4 (15%)	
Colon izquierdo	54 (55%)	8 (30%)	
<b>Estadio, n (%)</b>			
I	16 (16%)	2 (7%)	<b>0,01</b>
II	39 (40%)	7 (26%)	
III	35 (36%)	10 (37%)	
IV	8 (8%)	8 (30%)	
<b>T, n (%)</b>			
T1	5 (5,1%)	0 (0%)	<b>0,02</b>
T2	18 (18,4%)	2 (7,5%)	
T3	49 (50%)	10 (37%)	
T4	26 (26,5%)	15 (55,5%)	
<b>N, n (%)</b>			
N0	60 (61,2%)	10 (37%)	<b>0,00</b>
N1	28 (28,6%)	8 (30%)	
N2	10 (10,2%)	9 (33%)	

<b>N de ganglios afectados</b>			
Media	1,04 (+/- 2,06)	3,85 (+/- 7,12)	<b>0,01</b>
<b>M, n (%)</b>			
M0	89 (91%)	19 (70%)	<b>0,00</b>
M1-M2	9 (9%)	8 (30%)	
<b>Implantes, n (%)</b>			
No	90 (92%)	23 (85%)	<b>0,29</b>
Si	8 (8%)	4 (15%)	
<b>Invasión linfovascular, n (%)</b>			
No	70 (71%)	13 (48%)	<b>0,02</b>
Si	28 (29%)	14 (52%)	
<b>Invasión perineural, n (%)</b>			
No	78 (80%)	18 (67%)	<b>0,15</b>
Si	20 (20%)	9 (33%)	
<b>Pérdida de proteínas</b>			
No	95 (98,9%)	23 (85%)	<b>0,00</b>
Si	1 (1,1%)	4 (15%)	
<b>Índice apoptótico</b>			
Media	21,27 (+/-15,92)	17,91 (+/-10,02)	<b>0,61</b>
<b>Índice mitótico</b>			
Media	26,27 (+/-14,59)	24,16 (+/-13,85)	<b>0,38</b>
<b>MT a distancia, n (%)</b>			
No	74	15	<b>0,01</b>
Si	20	12	

#### **4.8.- Análisis de supervivencia**

Realizamos dos tipos de análisis de supervivencia: la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia tumoral específica (STE). Para el análisis de la SLE consideramos el tiempo transcurrido desde la cirugía con intención curativa hasta la metástasis o la muerte. En el grupo de pacientes analizados todas las muertes relacionadas con la enfermedad estaban precedidas por enfermedad metastásica. Para el análisis de la STE evaluamos el tiempo transcurrido desde la cirugía con intención curativa hasta la muerte por causas relacionadas con la enfermedad.

Durante el seguimiento clínico, 15 pacientes (14%) desarrollaron metástasis a distancia, 8 de ellos en más de un órgano. La localización de las metástasis fue la siguiente: peritoneo (carcinomatosis peritoneal) en 6 casos (40%), hígado en 5 casos (33%), pulmón en 4 casos (27%), metástasis ósea en 1 caso (7%), ovárica en 1 caso (7%) y cerebral en 1 caso (7%). 12 de los 15 casos que presentaban metástasis se encontraban en estadio clínico III en el momento del diagnóstico, 2 en estadio clínico II y 1 en estadio clínico I, lo que representa un 27%, 4% y 5% del total de casos en estadios III, II y I respectivamente.

Veintidós (22) pacientes murieron por causas relacionadas con la enfermedad, lo que representa un 18% de toda la serie. De estos casos, 1 se encontraba en estadio I, 1 en estadio II, 9 en estadio III y 11 en estadio IV en el momento del diagnóstico inicial (5%, 2%, 7% y 64% de cada estadio respectivamente). La STE fue de 63 meses para al menos el 25% de los pacientes de la serie (IC 95% entre 52 y más de 63 meses).

De forma global en todos los casos incluidos en la serie, observamos una significativa relación entre el estadio clínico y la SLE (HR en estadios III y IV: 7,68; IC 95%: 2,16-17,25;  $p=0,00$ ); y entre el estadio clínico y la STE (HR en estadios III y IV: 13,52; IC 95%: 3,15-57,95;  $p=0,00$ ) (Figura 12).

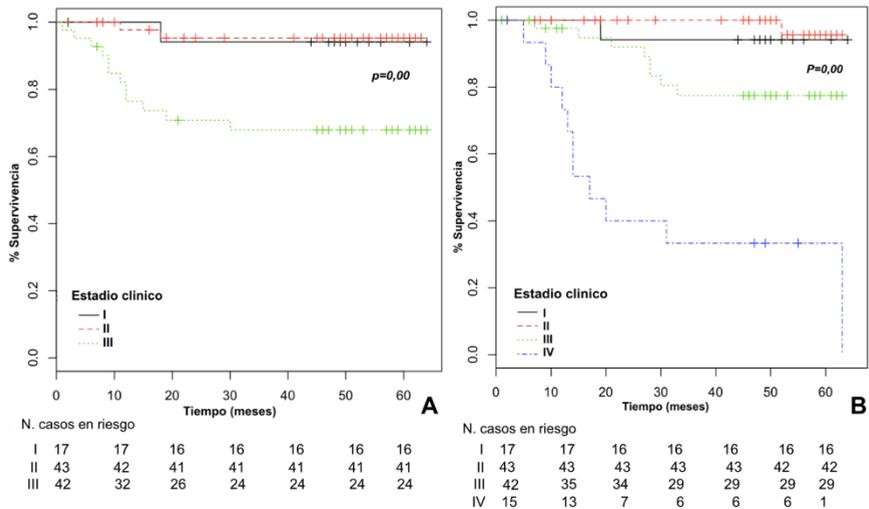


Figura 12: Análisis de supervivencia en toda la serie. A: SLE en estadios I al III. B: STE en pacientes en estadio I al IV.

Analizamos en cada estadio clínico la probabilidad de supervivencia en relación con las siguientes variables histopatológicas y moleculares: patrón de invasión tumoral, grado de diferenciación, invasión linfovascular, invasión perineural, número de ganglios linfáticos afectados, presencia de emperipolesis en las zonas de DTF, índice mitótico y apoptótico en las zonas de DTF, grado de DTF evaluado mediante los métodos 1, 2 y 3, y expresión tanto en el frente invasor como en el centro tumoral de miR200a, miR200b, miR200c, *ZEB1*, *ZEB2* y *PD-L1*.

#### **4.8.1.- Análisis de supervivencia en estadios II.**

##### ***Análisis de la SLE***

**Al analizar el grado de DTF en el grupo de pacientes en estadio clínico II, observamos que la clasificación obtenida por el método 3 fue la única que mostró una asociación significativa con la probabilidad de SLE.** Sin embargo, tal y como reflejan las curvas, la supervivencia en los casos de grado bajo e intermedio fue similar, por lo que la asociación resultó significativa solo cuando agrupamos estos últimos y los comparamos con los casos de alto grado (Figura 13). El análisis de riesgo mediante el test de Cox para esta variable resultó no concluyente.

**La expresión de miR200c en el frente invasor mostró una relación inversa con la SLE en pacientes en estadio clínico II.** En los casos con niveles de expresión de miR200c por debajo de la media, observamos una significativa reducción de la probabilidad de SLE en relación con los casos con niveles de expresión por encima de la media (Figura 14). El análisis de riesgo mediante el test de Cox para esta variable resultó no concluyente.

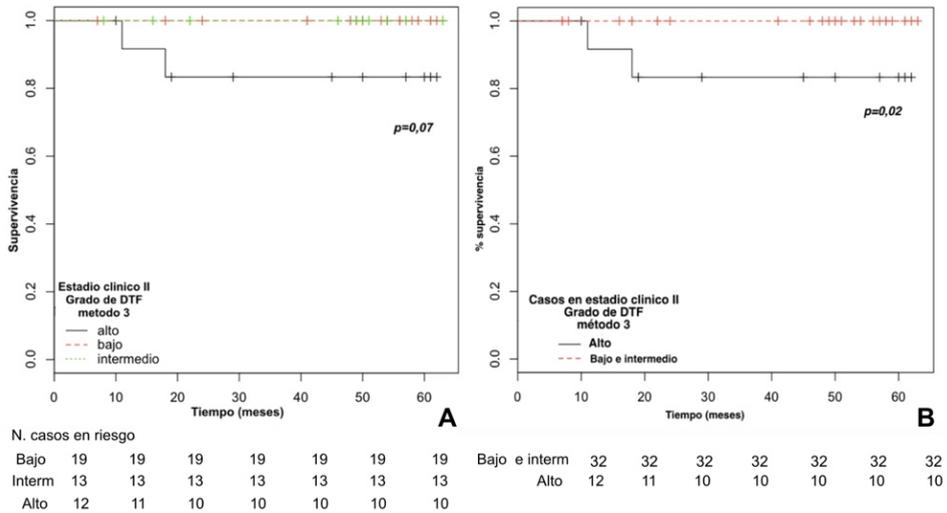


Figura 13: SLE en pacientes en estadio clínico II en relación con la DTF evaluada mediante el método 3. Las curvas de supervivencia de los casos de grado bajo e intermedio se superponen (A) por lo que las diferencias entre las curvas solo alcanzaron la significancia estadística al agrupar ambas categorías (B).

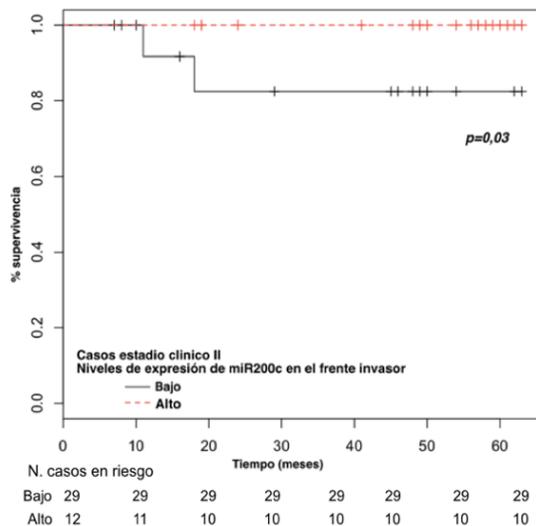


Figura 14: SLE en pacientes en estadio clínico II en relación con la expresión de miR200c en el frente invasor.

En este grupo de pacientes, el resto de las variables clinicopatológicas y moleculares analizadas, no mostraron una relación significativa con la probabilidad de recaídas, tanto en el análisis de log-rank como en el test de Cox univariante y multivariante.

### ***Análisis de la STE***

Ninguna de las variables analizadas se correlacionó significativamente con la probabilidad de STE en los pacientes en estadio clínico II.

## **4.8.2.- Análisis de supervivencia en estadios III.**

### ***Análisis de la STE***

**Al analizar los casos en estadio clínico III, observamos una relación significativa la STE y la DTF solo cuando esta fue evaluada mediante el método 2.** Sin embargo, nuevamente dicho nivel de significancia solo fue alcanzado cuando agrupamos los casos de grado bajo e intermedio, ya que como puede observarse en las curvas de supervivencia, la probabilidad de eventos en ambos grupos resultó similar. De esta forma, identificamos un significativo incremento de la STE en los casos de grado bajo e intermedio con respecto a los casos de alto grado (Figura 15). En el análisis de riesgo mediante el test de Cox esta diferencia estuvo muy cerca de la significancia estadística, aunque no llegó al alcanzarla (DTF grado bajo e intermedio HR: 0,23, IC al 95%: 0,04-1,14;  $p=0,07$ ).

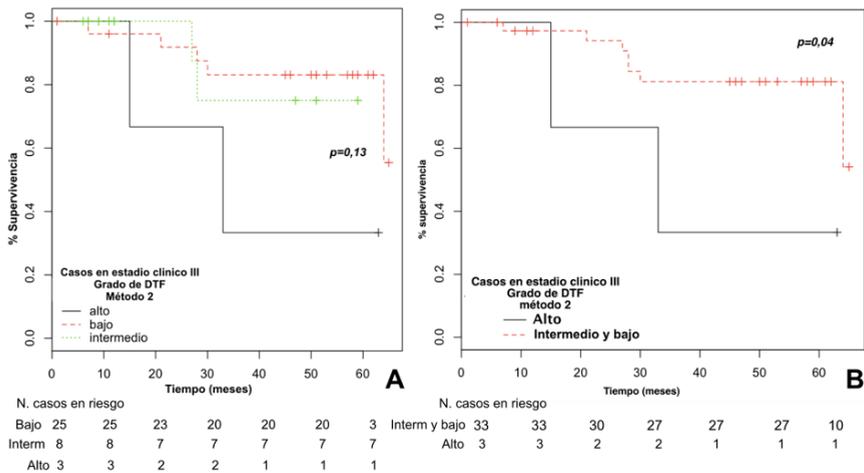


Figura 15: STE en pacientes en estadio clínico III en relación con la DTF evaluada mediante el método 2. Las curvas de supervivencia de los casos de grado bajo e intermedio son similares (A) por lo que las diferencias entre las curvas solo alcanzaron la significancia estadística al agrupar ambas categorías (B).

**Observamos una relación inversa entre la expresión de miR200c y miR200a en el frente invasor y la STE.** Los casos con niveles de expresión de miR200c por debajo de la media, mostraron un significativo incremento del riesgo de mortalidad en relación con los casos con niveles de expresión por encima de la media (expresión de miR200c por encima de la media HR: 0,14, IC 95%: 0,02-0,90;  $p=0,03$ ). Aunque en el caso de miR200a el sentido de la relación fue similar, en el estudio de riesgo mediante el test de Cox la fuerza de asociación resultó inferior (expresión de miR200a por encima de la media HR: 0,10, IC 95%: 0,01-1,01;  $p=0,05$ ) (Figura 16).

El resto de las variables clinicopatológicas y moleculares analizadas no mostraron una relación significativa con la probabilidad de mortalidad, tanto en el análisis de log-rank como en el test de Cox univariante.

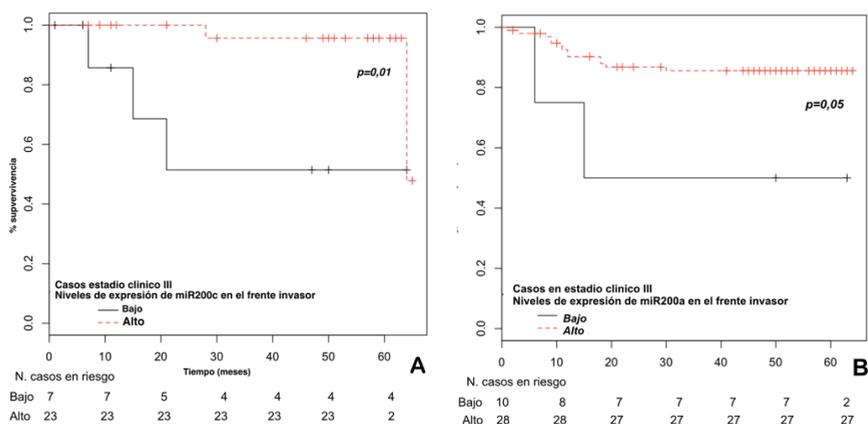


Figura 16: STE en pacientes en estadio clínico III en relación con la expresión de miR200c (A) y miR200a (B) evaluadas en el frente invasor.

En el análisis multivariante la única variable que mostró una relación significativa con la STE en los pacientes en estadio clínico III fue la expresión de miR200c en el frente invasor tumoral (Tablas 19 y 20).

<b>Tabla 19: Análisis multivariante de la STE en pacientes en estadio clínico III. Modelo 1.</b>			
Variable	HR	IC 95%	p valor
miR200c en el frente (alto)	0,12	0,01-0,8	<b>0,02</b>
MiR200a en el frente (alto)	0,10	0,04-1,84	0,06
DTF método 3 (grado bajo-intermedio)	0,20	0,01-2,25	0,19

<b>Tabla 20: Análisis multivariante de la STE en pacientes en estadio clínico III. Modelo 2.</b>			
Variable	HR	IC 95%	p valor
miR200c en el frente (alto)	0,15	0,02-0,99	<b>0,04</b>
DTF método 3 (grado bajo-intermedio)	0,84	0,11-6,24	0,87

### *Análisis de la SLE*

Ninguna de las variables analizadas se correlacionó significativamente con la probabilidad de SLE en los pacientes en estadio clínico III.

### **4.8.3.- Análisis de supervivencia en estadios I, II y III.**

#### *Análisis de la STE*

**Al analizar conjuntamente los casos en estadios I, II y III en relación con la DTF, solo la clasificación obtenida mediante el método 2 mostró una significativa relación con la STE.** Como puede observarse en las curvas de supervivencia, la probabilidad de mortalidad en los casos de grado bajo e intermedio resultó similar, por lo que el nivel de significancia de la diferencia entre las curvas mejoró al agrupar dichas categorías (DTF grado bajo e intermedio HR: 0,14, IC 95%: 0,03-0,70;  $p=0,01$ ) (Figura 17).

**La expresión de miR200c y miR200a en el frente invasor mostró una relación inversa con la probabilidad de STE.** En los casos con niveles de expresión de miR200c y miR200a por debajo de la media, observamos un significativo incremento del riesgo de mortalidad en relación con los casos con niveles de expresión por encima de la media. (expresión de miR200c por encima de la media HR: 0,23, IC 95%: 0,05-1,27;  $p=0,06$  y expresión de miR200a por encima de la media HR: 0,19, IC 95%: 0,03-1,02,  $p=0,05$ ) (Figura 18).

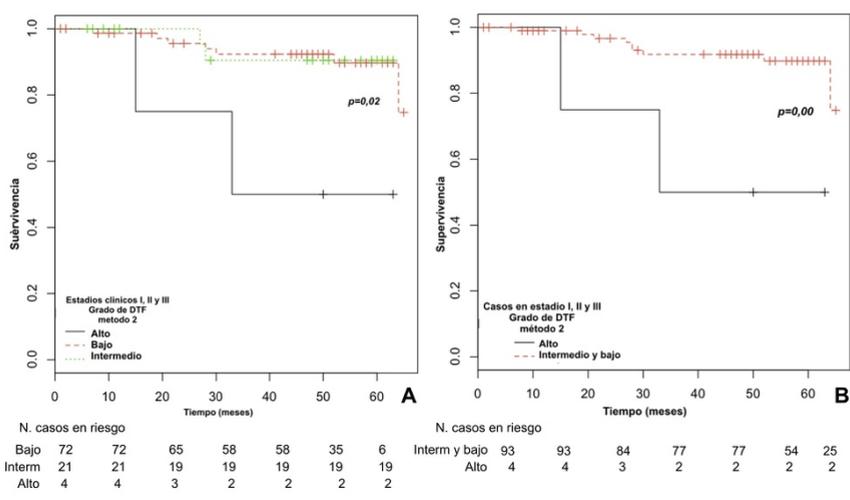


Figura 17: STE en pacientes en estadio I, II y III en relación con el grado de DTF evaluado mediante el método 2 (A). El nivel de significancia de la diferencia entre las curvas mejoró al agrupar los casos de grado bajo e intermedio (B).

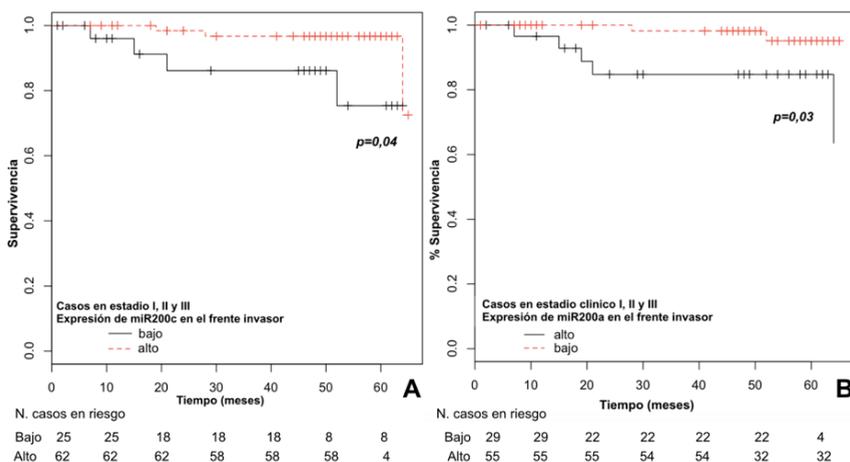


Figura 18: STE en pacientes en estadio clínico I, II y III en relación con la expresión de miR200c (A) y miR200a (B) evaluadas en el frente invasor.

El estadio clínico y la presencia de invasión linfovascular mostraron una significativa correlación con el riesgo de mortalidad en este grupo de casos

(estadios I-II HR: 0,13, IC 95%: 0,02-0,60;  $p=0,00$ ; e invasión linfovascular HR: 4,41, IC 95%: 1,26-15,37,  $p=0,01$ ) (Figura 19).

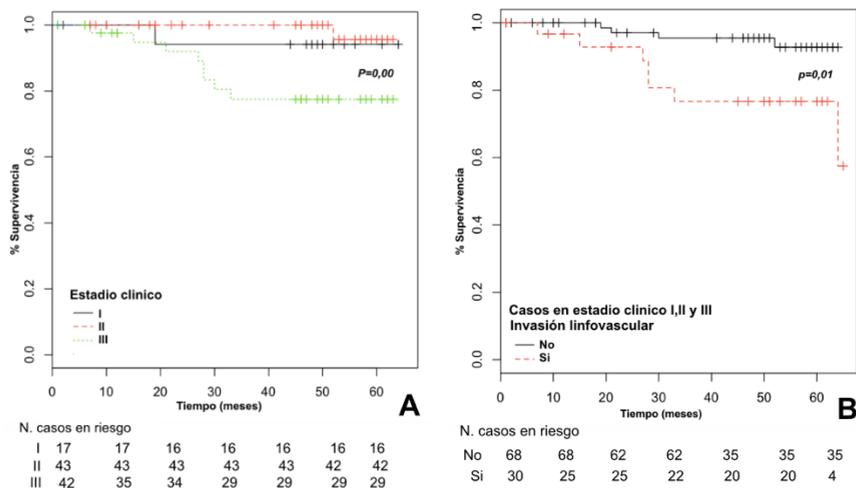


Figura 19: STE en pacientes en estadio clínico I, II y III en relación con el estadio clínico (A) y la presencia de invasión linfovascular (B).

El resto de las variables clinicopatológicas y moleculares analizadas, no mostraron una relación significativa con la probabilidad de mortalidad, tanto en el análisis de log-rank como en el test de Cox univariante.

**En el estudio multivariante, la expresión de miR200c en el frente invasor junto con el estadio clínico constituyen el mejor modelo de riesgo para la predicción de mortalidad en el grupo de pacientes en estadio clínico I, II y III.** De acuerdo con este modelo, la expresión de miR200c en el frente invasor influye significativamente en el riesgo y de forma independiente al estadio clínico (Tablas 21 al 24).

Tabla 21: Análisis multivariante de la STE en pacientes en estadio clínico I, II y III. Modelo 1.			
Variable	HR	IC 95%	p valor
miR200c en el frente (alto)	0,12	0,03-0,81	<b>0,02</b>
Estadio (I-II)	0,17	0,03-1,93	<b>0,04</b>

Tabla 22: Análisis multivariante de la STE en pacientes en estadio clínico I, II y III. Modelo 2.			
Variable	HR	IC 95%	p valor
Estadio (I-II)	0,18	0,03-0,94	<b>0,04</b>
Invasión linfovascular (si)	2,27	0,59-8,69	0,23

Tabla 23: Análisis multivariante de STE en pacientes en estadio clínico I, II y III. Modelo 3.			
Variable	HR	IC 95%	p valor
Estadio (I-II)	0,17	0,03-0,94	<b>0,04</b>
miR200a en el frente (bajo)	0,21	0,04-1,12	0,06

Tabla 24: Análisis multivariante de STE en pacientes en estadio clínico I, II y III. Modelo 4.			
Variable	HR	IC 95%	p valor
Estadio (I-II)	0,15	0,03-0,71	<b>0,01</b>
DTF método 2 (bajo-interm)	0,24	0,05-1,19	0,08

### ***Análisis de la SLE***

**En el análisis de la SLE de los casos en estadio I, II y III, observamos una significativa asociación con la DTF evaluada mediante el método 2. Al utilizar el método 2, el nivel de significancia estadística de la**

diferencia entre las curvas mejoró al agrupar los casos de grado bajo e intermedio (DTF de grado bajo e intermedio HR: 0,22, IC 95%: 0,04-0,98,  $p=0,04$ ) (Figura 20).

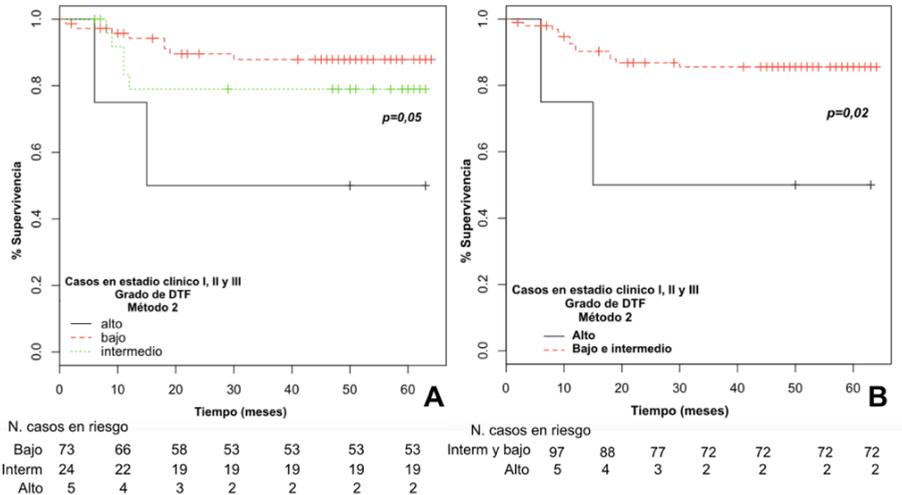


Figura 20: SLE en pacientes en estadio I, II y III en relación con el grado de DTF evaluado mediante el método 2 (A). El nivel de significancia de la diferencia entre las curvas mejoró al agrupar los casos de grado bajo e intermedio (B).

El estadio clínico, la presencia de invasión linfovascular y perineural mostraron una significativa relación con la probabilidad de recaídas en este grupo de casos (estadios III HR: 7,68, IC 95%: 2,16-27,25,  $p=0,00$ ; invasión linfovascular HR: 4,44, IC 95%: 1,57-12,5,  $p=0,00$ ; invasión perineural HR: 4,92, IC 95%: 1,77-13,64,  $p=0,00$ ) (Figura 21).

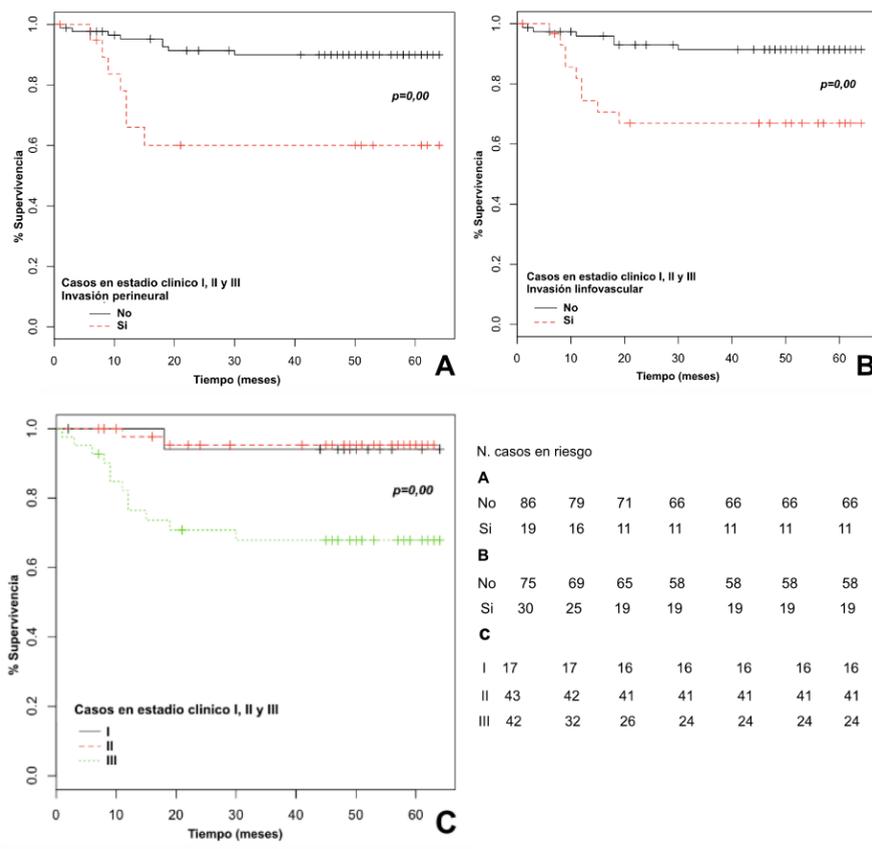


Figura 21: SLE en pacientes en estadio I, II y III en relación con la invasión perineural (A), invasión linfovascular (B) y el estadio clínico (C).

En el estudio multivariante de la SLE, ninguno de las variables evaluadas consiguió contribuir al modelo de riesgo en presencia del estadio clínico. (Tabla 25 al 27).

<b>Tabla 25: Análisis multivariante de SLE en pacientes en estadio clínico I, II y III. Modelo 1.</b>			
<b>Variable</b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p valor</b>
Estadio (III)	7,13	1,99-25,59	<b>0,00</b>
DTF método 2 (bajo-intermedio)	0,35	0,07-1,61	0,18

<b>Tabla 26: Análisis multivariante de SLE en pacientes en estadio clínico I, II y III. Modelo 2.</b>			
<b>Variable</b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p valor</b>
Estadio (III)	5,48	1,40-21,45	<b>0,01</b>
Invasión linfovascular (si)	2,21	0,62-6,76	0,16

<b>Tabla 27: Análisis multivariante de SLE en pacientes en estadio clínico I, II y III. Modelo 3.</b>			
<b>Variable</b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p valor</b>
Estadio (III)	5,58	1,44-21,62	<b>0,01</b>
Invasión perineural (si)	2,40	0,80-7,15	0,11

#### **4.8.4.- Análisis de supervivencia en estadios IV.**

**En los casos en estadio clínico IV observamos una relación inversa entre la expresión de miR200c en el frente invasor tumoral y la STE.** Los casos con niveles de expresión de miR200c por debajo de la media en el frente invasor mostraron un significativo incremento del riesgo de mortalidad durante el seguimiento clínico (HR: 5,20, IC 95%: 1,22-22,06,  $p=0,00$ ) (Figura 22).

**La expresión de ZEB2 y PD-L1 en el frente invasor se asoció de forma significativa con la STE.** Los casos con niveles de expresión de ZEB2 y PD-L1 por encima de la media, mostraron un incremento del riesgo de mortalidad durante el seguimiento. (ZEB2: HR: 0,07, IC 95%: 0,00-0,64,  $p=0,01$ ; PD-L1: HR: 0,20, IC 95%: 0,03-1,15,  $p=0,07$ ) (Figura 23).

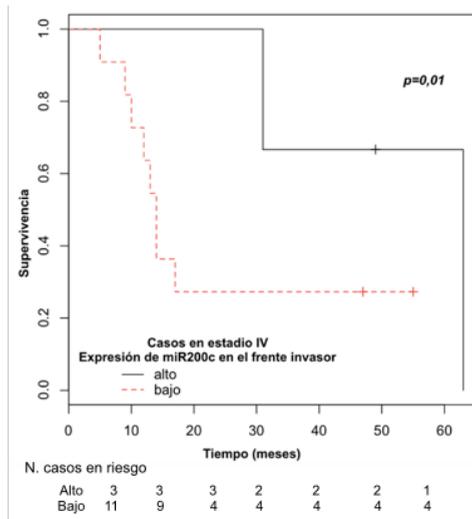


Figura 22: STE en pacientes en estadio IV en relación con la expresión de miR200c en el frente invasor.

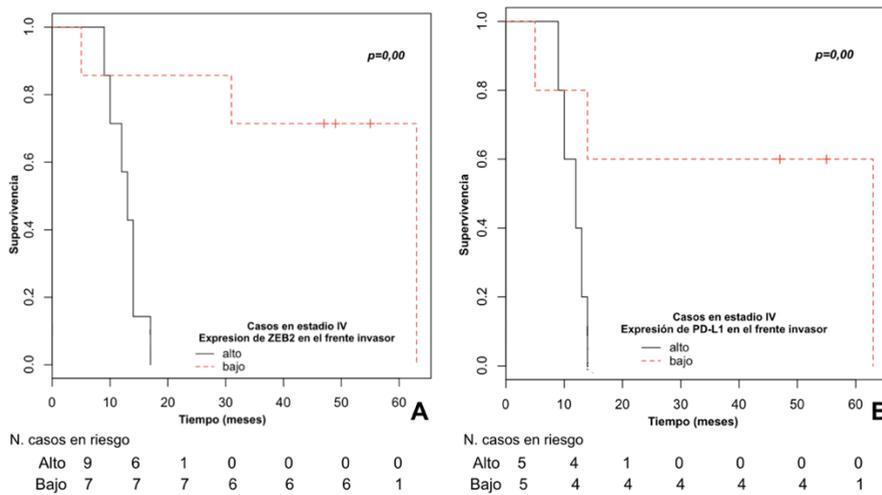


Figura 23: STE en pacientes en estadio IV en relación con la expresión de ZEB2 (A) y PD-L1 (B) en el frente invasor.

El resto de las variables clinicopatológicas y moleculares analizadas, no mostraron una relación significativa con la probabilidad de mortalidad en los casos en estadio clínico IV, tanto en el análisis de log-rank como en el test de Cox univariante.

**En el estudio multivariante de los casos en estadio clínico IV, la expresión de *ZEB2* en el frente invasor fue el único factor que mostró una asociación significativa con el riesgo de mortalidad, superando el valor estadístico del resto de las variables evaluadas en el modelo.** De acuerdo a este resultado, los casos con expresión de *ZEB2* en el frente invasor por encima de la media mostraron un significativo incremento del riesgo de mortalidad. (Tabla 28)

<b>Tabla 28: Análisis multivariante de la STE en pacientes en estadio clínico IV.</b>			
<b>Variable</b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p valor</b>
<i>ZEB2</i> (bajo)	0,08	0,00-0,85	<b>0,03</b>
<i>PD-L1</i> (bajo)	0,12	0,01-1,23	0,07
miR200c (bajo)	3,75	0,76-18,38	0,10

## V.- DISCUSIÓN

La estratificación del riesgo en los pacientes con CCR resulta imprescindible para la toma de decisiones en la práctica diaria, especialmente en los estadios clínicos intermedios. En los casos en estadio II, esta estratificación es fundamental para seleccionar pacientes candidatos a tratamiento quimioterápico, o para desestimarlos en los casos de bajo riesgo y así evitar la comorbilidad asociada. En los casos en estadio III, la indicación de tratamiento adyuvante es más clara, y los factores de riesgo aportan información útil para la predicción de recaídas indicando la necesidad de un seguimiento más estrecho. La DTF o *tumor budding* es uno de los parámetros más prometedores en este sentido, y la reciente clasificación de consenso de la ITBCC permite su implementación e incorporación en los informes patológicos de rutina.<sup>2</sup> En nuestra serie, hemos observado una clara y constante relación entre el grado de DTF (independientemente del método utilizado para valorarla) y factores determinantes en el pronóstico de la enfermedad como son el tamaño tumoral (pT), el número de ganglios linfáticos afectados y la presencia de invasión linfovascular. Otros factores de alto riesgo en el CCR como son el grado de diferenciación histológica, la presencia de invasión perineural y de implantes neoplásicos, se correlacionaron de forma variable con el grado de DTF de acuerdo al método utilizado para su valoración. No observamos una relación significativa entre el estado de IMS y la presencia de DTF, lo que sugiere como ya han comentado otros autores, que la DTF es más frecuente en los casos MSS y que, por lo tanto, la información que ambos factores aportan es complementaria.<sup>56,98,99</sup> En nuestra serie, observamos una asociación significativa entre la supervivencia y la DTF únicamente cuando

esta última fue evaluada mediante los métodos 2 y 3. A pesar de que el consenso de la ITBCC recomienda la valoración de la DTF en 1 campo en HE (método 1), la clasificación obtenida por este método no se correlacionó de forma significativa con la supervivencia en ninguno de los estadios clínicos evaluados. Por lo tanto, la evaluación de la DTF limitada a solo un campo en la HE parece un método insuficiente para el recuento, y la evaluación en un mayor número de campos (método 2), así como la inmunotinción (método 3) mejoran la sensibilidad de la técnica.

Al aplicar el método 2 (recuento de 10 campos en HE), observamos una significativa asociación con la supervivencia tanto en el análisis de los casos en estadio III, como al analizar los casos en estadio I, II y III de forma conjunta. El número de casos clasificados en el grupo de alto grado mediante el método 2 fue muy inferior con respecto al obtenido mediante el resto de los métodos (4%, 38,5%, y 32% mediante los métodos 2, 1 y 3 respectivamente), posiblemente por el efecto de “dilución” ocasionado al calcular el promedio del recuento entre los 10 campos evaluados. Los casos clasificados dentro del grupo de alto grado mediante el método 2, aunque escasos, son casos con recuentos de DTF muy elevados, que se asociaron significativamente a una peor supervivencia, lo que sugiere, como han comentado otros autores, que el recuento en 10 campos es más representativo con respecto a la valoración en solo un campo.<sup>40</sup> Aunque son pocas las series que exploran la influencia de la DTF en el CCR en estadio III, estos resultados coinciden los de otros autores.<sup>43</sup>

En las recomendaciones de consenso de la ITBCC el valor de la inmunotinción para la valoración de la DTF quedó abierta a debate y se reconoció su posible utilidad en casos difíciles de clasificar. En nuestra serie, además de mejorar la estratificación de riesgo con respecto a la valoración de

1 campo en la HE (método 1), la clasificación mediante la valoración en la CKAE1/AE3 (método 3) fue la única que se correlacionó significativamente con la probabilidad de recaídas en los casos en estadio clínico II. Adicionalmente, la inmunotinción para CK permitió clasificar adecuadamente 15 casos cuyo denso infiltrado inflamatorio impedía valorar adecuadamente la DTF. Tres de estos casos fueron reclasificados en el grupo de grado intermedio, y 12 en el grupo de bajo grado. Otros autores han demostrado el valor de la CKAE1/AE3 para mejorar la estratificación de riesgo y la reproducibilidad interobservador de la gradación de la DTF.<sup>4,22,29,37,39,40,100</sup>

Un hallazgo destacable en todos los casos fue que el nivel de la significancia estadística en el análisis de la DTF mediante los métodos 2 y 3 mejoró considerablemente al analizar conjuntamente los casos de grado bajo e intermedio, ya que la probabilidad de supervivencia en ambos grupos fue bastante similar. Estos datos sugieren que quizás un sistema de gradación dicotómico tal y como han utilizado otros autores, sería más eficiente para la gradación.<sup>25,33,35-38</sup>

La presencia de DTF en mayor o menor grado es una constante en los tumores con patrón de crecimiento infiltrativo (100% de los casos), y este último se correlacionó de forma significativa con los mismos factores de mal pronóstico asociados a la DTF. Por lo tanto, la DTF podría considerarse como una forma de estratificar el grado de infiltración de una lesión, lo que permite “afinar” el riesgo asociado al patrón de crecimiento infiltrativo descrito hace más de 30 años.<sup>28</sup>

En las zonas de DTF observamos escasa actividad mitótica y apoptótica, que se incrementó levemente y de forma proporcional con el grado de DTF. A diferencia de los resultados de otros autores, no observamos relación entre la

actividad mitótica y apoptótica en las células en DTF y el pronóstico de la enfermedad.<sup>101</sup> Esta reducción en la capacidad proliferativa de las células se ha descrito durante la progresión neoplásica como parte de la teoría “*go or growth*” (crece o muere) en el que la célula maligna entra en un estado quiescente asociado a un incremento de la motilidad celular.<sup>101,102</sup> Estos resultados también soportan la hipótesis del proceso de TEM como el mecanismo patogénico principal en las áreas de DTF del CCR, donde se ha demostrado que existe una sobreexpresión de genes implicados en la detención del ciclo celular tales como ciclinaD1 y p16, importantes dianas de B-catenina.<sup>8,101,103,104</sup> De acuerdo a nuestros hallazgos, la emperipolesis es un evento frecuente en las zonas de DTF y su frecuencia se incrementa de forma proporcional con el grado de DTF. Este fenómeno también denominado “entosis”, “cell in cell” o “suicidio celular asistido” se ha descrito en varios tumores y se asocia a una mayor capacidad agresiva y a un elevado potencial metastásico.<sup>105–111</sup> Durante la entosis, la célula ingerida sufre un proceso degenerativo con reducción progresiva del tamaño y condensación de su citoplasma y su núcleo hasta su desaparición completa, formando imágenes similares a las que hemos observado en nuestros casos.<sup>111,112</sup> Varios autores han demostrado que la expresión de cadherina es un requisito indispensable para que ocurra la emperipolesis o entosis, lo que sugiere que este proceso podría considerarse como un mecanismo de selección adyuvante en la TEM, en el que las células que aun expresan cadherina en cantidad suficiente, incapaces de sufrir apoptosis, son reconocidas y eliminadas por sus células vecinas.<sup>107,110–114</sup>

De acuerdo a la reciente clasificación molecular de consenso del CCR, los tumores con fenotipo mesenquimal asociados a la activación de TGF- $\beta$

constituyen el subgrupo de peor pronóstico con un elevado potencial agresivo.<sup>115,116</sup> Este grupo de tumores se caracteriza por la sobreexpresión de genes relacionados con el proceso de TEM como *ZEB1* y *ZEB2*. *ZEB1* es una diana directa de TGF- $\beta$ , y la expresión de *ZEB1* se ha incorporado a varios algoritmos para identificar tumores con fenotipo mesenquimal.<sup>117</sup> La familia miR200 es un importante regulador de la expresión de ZEB a través de la vía de señalización autocrina TGF- $\beta$ /*ZEB*/miR-200.<sup>11,93</sup> Mediante esta vía, zeb se une al promotor de miR200 e inhibe su transcripción. Sin embargo, la expresión de miR200 también puede inhibirse por mecanismos epigenéticos, de hecho, la metilación bialélica del promotor se ha demostrado como un factor útil para identificar casos de CRC correspondientes al fenotipo mesenquimal CMS4 de la clasificación molecular.<sup>118</sup> En nuestra serie, los niveles de expresión de miR200 y *ZEB* variaron significativamente en el frente invasor con respecto al centro del tumor. En el frente invasor observamos una reducción de la expresión de miR200 y un incremento de *ZEB*, un perfil que podríamos considerar como compatible con el proceso de TEM en base a los argumentos expuestos. La infra expresión de la familia miR200 se ha descrito en el frente invasor del CCR en relación con la expresión de marcadores de TEM y el desarrollo de metástasis.<sup>81,82,85,118</sup>

Encontramos una asociación significativa entre la infra expresión de miR200c y miR200a en el frente invasor y la supervivencia en los estadios II y III y en el análisis conjunto de los estadios I al III. En los casos en estadio clínico IV, aquellos con niveles inferiores de miR200c y sobreexpresión de *ZEB2* y PD-L1 en el frente invasor mostraron una significativa reducción de la STE. Cabe destacar que, en todos los casos, la expresión de estas mismas

moléculas en el centro del tumor no mostró una influencia significativa en la supervivencia. Este hallazgo refleja sin duda la importancia de la heterogeneidad tumoral y la influencia de la selección de la muestra para el estudio del fenotipo molecular de la lesión. Varios autores han demostrado que la mayor parte de los genes asociados a peor pronóstico en el CCR, incluyendo genes importantes que caracterizan al fenotipo mesenquimal como TGF- $\beta$ , están derivados en realidad de las células estromales asociadas al tumor.<sup>114,117,65</sup> Por lo tanto, el frente invasor tumoral probablemente sea la zona más idónea para valorar la expresión de biomarcadores, no solo por la presencia de DTF en las células neoplásicas, sino por la mayor concentración de estroma y de celularidad inflamatoria en esta zona.<sup>121</sup>

A pesar de que las variaciones de expresión de miR200 y *ZEB* en el frente invasor no se correlacionaron directamente con el grado de DTF, el incremento de la expresión de *PD-L1* en el frente invasor con respecto al centro del tumor, fue muy superior en las lesiones con DTF de alto grado con respecto a las lesiones de grado bajo e intermedio. En el estudio inmunohistoquímico de *PD-L1*, el patrón de expresión de la proteína fue concordante con los resultados obtenidos mediante PCR, ya que tanto en los casos con DTF de alto grado como en los casos de bajo grado, observamos expresión de *PD-L1* en el frente invasor, pero no en el centro del tumor. En los casos de bajo grado, la expresión se limitaba a la celularidad inflamatoria histiocitaria peritumoral, y en los casos de alto grado observamos expresión en las células en DTF. (Anexo 1). Estos hallazgos, sugieren que posiblemente el incremento en la expresión de *PD-L1* podría actuar como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune relacionado con la DTF y el proceso de TEM tal y como han señalado otros

autores en tumores de esófago, mama, páncreas y pulmón.<sup>24,65,87,94,122,123</sup> La significativa correlación observada en nuestro estudio entre la expresión de *DP-L1* y el perfil de expresión compatible con TEM (reducción de la expresión de miR200a y miR200c, e incremento de expresión de *ZEB1* y *ZEB2*), favorecen esta hipótesis.<sup>93,94</sup>

Por lo tanto, la infra expresión de miR200c en el frente invasor caracteriza un grupo de tumores con un mayor potencial agresivo y una mayor activación del proceso de TEM, posiblemente correspondientes al subtipo mesenquimal CMS4 de la clasificación molecular del CRC. La activación del proceso de TEM en estas áreas, reflejada histológicamente como imágenes de DTF, se asocia a un fenotipo evasor de la respuesta inmune a través de la expresión de PD-L1. Por estos motivos, el frente invasor tumoral debe ser incluido de forma sistemática en las muestras para estudios de biomarcadores en el CRC.

## VI.-CONCLUSIONES:

**Conclusión 1:** la valoración de varios campos en la HE (método 2) y en menor medida, la inmunotinción (método 3), mejoran sustancialmente la valoración de la DTF y la estratificación del riesgo con respecto a la valoración en un solo campo en la HE recomendada por la ITBCC (método 1).

- La supervivencia en los casos con DTF de grado bajo e intermedio es similar independientemente del método utilizado, por lo que un sistema de gradación dicotómico sería más reproducible y obtendría una asociación más robusta con respecto al riesgo.
- La DTF se asocia significativamente a factores de mal pronóstico conocidos en el cáncer de colon independientemente del método utilizado para su valoración.
- Las células tumorales en DTF muestran un estado quiescente con mínima actividad mitótica y apoptótica y extensa emperipolesis. La emperipolesis en estas áreas podría representar un mecanismo de muerte alternativo a la apoptosis que permite la selección tumoral relacionada con el proceso de TEM.

**Conclusión 2:** El frente invasor tumoral con mayor densidad de DTF presenta un perfil de expresión molecular compatible con TEM (reducción de miR200 e incremento de ZEB en relación con el centro del tumor).

**Conclusión 3:** La sobreexpresión de *PD-L1* podría considerarse como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune relacionado con la DTF y con el proceso de TEM.

**Conclusión 4:** La infra expresión de miR200c en el frente invasor caracteriza un grupo de tumores más agresivos, con una mayor activación del proceso de TEM, posiblemente correspondientes al subtipo mesenquimal CMS4 de la clasificación molecular del CRC.

- El frente invasor del CCR parece el tejido más idóneo para la valoración de la expresión de biomarcadores, probablemente por la mayor cantidad de celularidad estromal e inflamatoria y por la presencia de DTF esta zona.

## VII.- BIBLIOGRAFIA

1. Guinney J, Dienstmann R, Wang X *y col.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21:1350-1356.
2. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y *y col.* Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod pathol.* 2017;30:1299-1311.
3. Ueno H, Murphy J, Jass JR *y col.* Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology.* 2002;40:127-132.
4. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli, A. Tumor budding in colorectal cancer - Ready for diagnostic practice?. *Hum. Pathol.* 2016;47:4-19.
5. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget.* 2010;1:651-61.
6. Oku Y, Shimoji T, Takifuji K *y col.* Identification of the molecular mechanisms for dedifferentiation at the invasion front of colorectal cancer by a gene expression analysis. *Clin Cancer Res.* 2008;14:7215-22.
7. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH *y col.* Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol.* 2012;25:1315-25.
8. Dan Grigore A, Kumar Jolly M, Jia D *y col.* Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med.* 2016, doi: 10.3390/jcm5050051.
9. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* 2009, doi: 10.1146/annurev.med.59.053006.104707.
10. Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: At the crossroads of signal transduction in cancer. *Int. J. Cancer.* 2012;132:745-754.
11. Burk U, Schubert J, Wellner U *y col.* A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 2008;9:582-589.
12. Humphries B, Yang C. The microRNA-200 family : small molecules with novel roles in cancer development , progression and therapy. *Oncotarget.* 2015;6:6472-6498
13. Chen L, Gibbons DL, Goswami S *y col.* Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumor cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun.* 2014, doi:10.1038/ncomms6241.

14. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM y col. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol.* 2017;3:524-548.
15. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2016;7:105-114.
16. Van de Velde CJ, Boelens PG, Borras JM y col. EURECCA colorectal: multidisciplinary management: European consensus conference colon & rectum. *Eur J Cancer.* 2014, doi: 10.1016/j.ejca.2013.06.048.
17. Quirke P, Risio M, Lambert R y col. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis-European recommendations. *Virchows Arch.* 2011;458:1-19.
18. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A y col. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol.* 2012;23:2479-516.
19. Amin M, Edge S, Greene F y col. AJCC cancer staging manual. 8th ed. New York: Springer, 2017.
20. Beaton C, Twine CP, Williams GL y col. Systematic review and meta-analysis of histopathological factors influencing the risk of lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2013;15:788-797.
21. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ y col. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;3:124:979.
22. De Smedt L, Palmans S, Sagaert X. Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do?. *Virchows Arch.* 2016;468:397-408.
23. Zlobec I, Molinari F, Martin V y col. Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. *World J. Gastroenterol.* 2010;16:4823-4831.
24. Kohler I, Bronsert P, Timme S y col. Detailed analysis of epithelial-mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of long-term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015;30:78-84.
25. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology.* 2007;50:151-162.

26. Graham RP, Vierkant RA, Tillmans LS *y col.* Tumor budding in colorectal carcinoma: confirmation of prognostic significance and histologic cutoff in a population-based cohort. *Am J Surg Pathol.* 2015;39:1340-1346.
27. Hase K, Shatney C, Johnson D *y col.* Prognostic value of tumor ‘budding’ in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1993;36:627–635.
28. Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet.* 1987;1:1303–1306
29. Koelzer VH, Zlobec I, Berger MD *y col.* Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch.* 2015;466: 485–493.
30. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S *y col.* Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 2005;52:1432-1435.
31. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 2003;83:42-47.
32. Park KJ, Choi HJ, Roh MS *y col.* Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum.* 2005;48:1597-1602.
33. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H *y col.* Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2009;33:134-141.
34. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K *y col.* An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer.* 1989;63:539-543.
35. Ueno H, Price AB, Wilkinson KH *y col.* A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg.* 2004;240:832–839.
36. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y *y col.* Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;127:385-394.
37. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kölzer V *y col.* Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2012;26:295-301.
38. Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H *y col.* Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum.* 2008;51:568-572.
39. Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology.* 2005;47:17-24.

40. Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E *y col.* Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2013;44:697-705.
41. Bosch S, Teerenstra S, De Wilt JW *y col.* Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: A systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy.* 2013;45:827-834.
42. Barresi V, Branca G, Ieni A *y col.* Poorly differentiated clusters (PDCs) as a novel histological predictor of nodal metastases in pT1 colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2014;464:655-662.
43. Choi HJ, Park KJ, Shin JS *y col.* Tumor budding as a prognostic marker in stage-III rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22:863–868.
44. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H *y col.* New Criteria for Histologic Grading of Colorectal Cancer. *Am J Surg Pathol.* 2012;36:193–201.
45. Imai T. Growth patterns in human carcinoma. Their classification and relation to prognosis. *Obstet Gynecol.* 1960;16:296-308.
46. Carr I, Levy M, Watson P. The invasive edge: invasion in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis.* 1986;4:129-139.
47. Gabbert H, Wagner R, Moll R *y col.* Tumor dedifferentiation: An important step in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis.* 1985;3:257-279.
48. Reggiani Bonetti LR, Barresi V, Bettelli S *y col.* Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer : what is and ought to be known. *Diagn Pathol.* 2016;22:11–31.
49. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Branca G *y col.* Colorectal carcinoma grading by quantifying poorly differentiated cell clusters is more reproducible and provides more robust prognostic information than conventional grading. *Virchows Arch.* 2012;461:621-628.
50. Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E *y col.* Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2013;44:697-705.
51. Puppa G, Senore C, Sheahan K *y col.* Diagnostic reproducibility of tumour budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy. *Histopathology.* 2012;61:562-75.
52. Jass JR, Barker M, Fraser L *y col.* APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J. Clin. Pathol.* 2003;56:69-73.

53. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Natl Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:178-196.
54. Kalluri R, Weinberg R. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009;119:1420–1428.
55. Loboda A, Nebozhyn MV, Watters JW *et al.* EMT is the dominant program in human colon cancer. *BMC Med Genomics.* 2011;20:4-9.
56. Kevans D, Wang LM, Sheahan K *et al.* Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Protein Expression in a Cohort of Stage II Colorectal Cancer Patients With Characterized Tumor Budding and Mismatch Repair Protein Status. *Int J Surg Pathol.* 2011;19:751-760.
57. De Smedt L, Palmans S, Andel D *et al.* Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. *Br J Cancer.* 2017;116:58-65.
58. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Publ.* 2012;13:767–779.
59. Sun BO, Fang Y, Li Z *et al.* Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. *Biomed Rep.* 2015;3:603-610.
60. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2016;19:156–172.
61. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* 2014;7:re8.
62. Kawabata M, Imamura T, Inoue H *et al.* Intracellular signaling of the TGF- $\beta$  superfamily by Smad proteins. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;886:73-82.
63. Peinado H, Olmeda D, Cano, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:415–428.
64. Vandewalle C, Comijn J, Craene BD *et al.* SIP1 / ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:6566-6578.
65. Becker C, Fantini MC, Neurath MF. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17:97-106.
66. Bierie B, Moses HL. TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17:29-40.

67. Chen J, Mishra L. Targeting TGF-  $\beta$  signaling in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17:743-760.
68. Friedman E, Gold LI, Klimstra D *et al*. High levels of transforming growth factor  $\beta$ 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995;4:549-554.
69. Jensen DH, Dabelsteen E, Specht L *et al*. Molecular profiling of tumour budding implicates TGF $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. *J. Pathol*. 2015;236:505-516.
70. Lampropoulos P, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S *et al*. TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2012;314:1-7.
71. Dunne PD, McArt DG, Bradley CA *et al*. Challenging the cancer molecular stratification dogma: Intratumoral heterogeneity undermines consensus molecular subtypes and potential diagnostic value in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22:4095-4104.
72. Becker C, Riedmaier I, Pfaffl MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*. 2010;50:237-243.
73. Macfarlane L, Murphy, PR. MicroRNA : Biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics*. 2010;11:537-561.
74. Park JH, Shin C. MicroRNA-directed cleavage of targets: mechanism and experimental approaches. *BMB Rep*. 2014;47:417-423.
75. Friedman RC, Farh KK, Burge CB *et al*. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19:92-105.
76. Peng Y, Croce C. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2016, doi:10.1038/sigtrans.2015.4.
77. Nana-sinkam SP, Croce CM. Clinical Applications for microRNAs in Cancer. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;93:98-104.
78. Sun J, Ding W, Zhi J *et al*. MiR-200 suppresses metastases of colorectal cancer through ZEB1. *Tumor Biol*. 2015, doi:10.1007/s13277-015-3822-3.
79. Senfter D, Holzner S, Kalipciyan M *et al*. Loss of miR-200 family in 5-fluorouracil resistant colon cancer drives lymphendothelial invasiveness in vitro. *Hum Mol Genet*. 2015;24:3689-3698.
80. Radisky, DC. miR-200c at the nexus of epithelial-mesenchymal transition, resistance

- to apoptosis, and the breast cancer stem cell phenotype. *Breast Cancer* 2011;13:110-111.
81. Paterson EL, Kazenwadel J, Bert AG y col. Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression. *Neoplasia*. 2013;15:180–191.
  82. Qiong P, Linkun M, Jun Y y col. Transcriptional repression of miR-200 family members by Nanog in colon cancer cells induces epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Cancer Lett*. 2017;392:26–38.
  83. Maierthaler M, Benner A, Hoffmeister M y col. Plasma miR-122 and miR-200 family are prognostic markers in colorectal cancer. *Int. J. cancer*. 2017;1:176-187.
  84. Knudsen KN, Lindebjerg J, Nielsen BS y col. MicroRNA-200b is downregulated in colon cancer budding cells. *PLoS One*. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0178564
  85. Hur K, Toiyama Y, Takahashi M y col. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2013;62:1315-1326.
  86. Topalian SL, Taube JM, Anders RA y col. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:275-87.
  87. Chen J, Jiang CC, Jin L y col. Regulation of PD-L1 : a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol*. 2016;27:409-416.
  88. Guan J, Lim KS, Mekhail T y col. Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in the Programmed Death Receptor-1 (PD-1)/PD-L1 Blockade. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141:851-861.
  89. Xiao Y, Freeman GJ. The microsatellite instable subset of colorectal cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Discov*. 2015;5:16-18.
  90. Sanchez-Castañón M, Er TK, Bujanda, L y col. Immunotherapy in colorectal cancer: What have we learned so far? *Clin Chim Acta*. 2016;460:78–87.
  91. Le DT, Uram JN, Wang H y col. PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372:2509-2520.
  92. Kim JH, Park HE, Cho NY y col. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2015;115:490–496.

93. Gregory PA, Bracken CP, Smith E *et al.* An autocrine TGF-  $\beta$  / ZEB / miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell.* 2011;22:1686-1698.
94. Chen L, Gibbons DL, Goswami S *et al.* Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumor cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun.* 2014;5:5241:5265.
95. Noman MZ, Janji B, Abdou A *et al.* The immune checkpoint ligand PD-L1 is upregulated in EMT-activated human breast cancer cells by a mechanism involving ZEB-1 and miR-200. *Oncoimmunology.* 2017, doi: 10.1080/2162402X.2016.1263412.
96. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods.* 2001;25:402-408.
97. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
98. Rosty, C. Should the grading of colorectal adenocarcinoma include microsatellite instability status? *Hum. Pathol.* 2014;45:2077–2084.
99. Barresi V, Bonetti LR. Correlation between microsatellite instability status and grading assessed by the counting of poorly differentiated clusters in colorectal cancer. *Hum. Pathol.* 2015;46:1063.
100. Ohtsuki K, Koyama F, Tamura T *et al.* Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2008;28:1831-1836.
101. Dawson H, Koelzer VH, Karamitopoulou E *et al.* The apoptotic and proliferation rate of tumour budding cells in colorectal cancer outlines a heterogeneous population of cells with various impacts on clinical outcome. *Histopathology.* 2014;64:577-584.
102. Hatzikirou H, Basanta D, Simon M *et al.* ‘Go or grow’: The key to the emergence of invasion in tumour progression? *Math Med Biol.* 2012;29:49-65.
103. Palmqvist R, Stenling R. Human Colorectal Cancers with an Intact p16/Cyclin D1/pRb Pathway have up-regulated p16 expression and decreased proliferation in small invasive tumor clusters. *Am J Pathol.* 2000;157:1947-1953.
104. Rubio CA. Arrest of Cell Proliferation in Budding Tumor Cells Ahead of the Invading Edge of Colonic Carcinomas. *Anticancer Res.* 2008;28:2417-2420.

105. Rausch V, Liu L, Apel A *y col.* Autophagy mediates survival of pancreatic tumour-initiating cells in a hypoxic microenvironment. *J. Pathol.* 2012;227:325–335.
106. Sun Q, Huang H, Overholtzer M. Cell-in-cell structures are involved in the competition between cells in human tumors. *Mol Cell Oncol.* 2015. doi: 10.1080/23723556.2014.1002707
107. Krishna S, Overholtzer M. Mechanisms and consequences of entosis. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:2379-2386.
108. Sun Q, Luo T, Ren Y *y col.* Competition between human cells by entosis. *Cell Res.* 2014;24:1299-1310.
109. Sharma N, Dey P. Cell Cannibalism and Cancer. *Diagn. Cytopathol.* 2011;39:229-33.
110. Yang YQ, Li JC. Progress of Research in Cell-in-Cell Phenomena. *Anat Rec.* 2012;295:372–377.
111. Guadamillas MC, Cerezo A, Del Pozo MA. Overcoming anoikis-pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J. Cell Sci.* 2011;124:3189–3197.
112. Garanina AS, Khashba LA, Onishchenko GE. Stages of cell cannibalism-entosis in normal human keratinocyte culture. *Biochem.* 2015;80:1469-1477.
113. Sun Q, Cibas ES, Huang *y col.* Induction of entosis by epithelial cadherin expression. *Cell Res.* 2014;24:1288-98.
114. Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G *y col.* A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell.* 2007;131:966-979.
115. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llergo A *y col.* Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015;47:320–329.
116. Müller MF, Ashraf EK, Arends M. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2016; 469: 125–134
117. Trinh A, Trumpi K, De Sousa E Melo F *y col.* Practical and Robust Identification of Molecular Subtypes in Colorectal Cancer by Immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 2017;23:387-398.
118. Fessler E, Jansen M, De Sousa E Melo F *y col.* A multidimensional network approach reveals microRNAs as determinants of the mesenchymal colorectal cancer subtype. *Oncogene.* 2016;35:6026-6037.
119. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487:330-337.

120. Isella C, Terrasi A, Bellomo SE y col. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nat Genet.* 2015;47:312–319.
121. Zlobec I, Lugli A. Invasive front of colorectal cancer : Dynamic interface of pro-anti-tumor factors. *World J Gastroenterol.* 2009;15:5898-5906.
122. Kim S, Koh J, Kim MY y col. PD-L1 expression is associated with epithelial-to-mesenchymal transition in adenocarcinoma of the lung. *Hum Pathol.* 2016;58:7-14.
123. Alsuliman A, Colak D, Al-Harazi O y col. Bidirectional crosstalk between PD-L1 expression and epithelial to mesenchymal transition: significance in claudin-low breast cancer cells. *Mol. Cancer.* 2015;14:149-157.

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de PD-L1.

Con la finalidad de ilustrar los resultados obtenidos mediante qRT-PCR, valoramos la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en 10 casos: 5 casos con DTF de alto grado y 5 casos con DTF de bajo grado.

La técnica inmunohistoquímica se realizó de forma automatizada utilizando el sistema Autostainer Link 48 (Dako, Glostrup, Dinamarca, Agilent) con el anticuerpo monoclonal: *PD-L1* 28-8, Leyca microsystem, Germany. La expresión fue valorada tanto en las células inflamatorias como en las células tumorales.

En todos los casos encontramos un incremento en la expresión de *PD-L1* en el frente invasor con respecto al centro del tumor, sin embargo, la distribución de la tinción fue diferente en ambos grupos. En los 5 casos (100%) con DTF de bajo grado, las células tumorales resultaron negativas tanto en el centro de la lesión como en el frente invasor. En el 100% de estos casos observamos positividad en la celularidad inflamatoria peritumoral del frente invasor, especialmente en los macrófagos peritumorales. (Figura A1)

En 2 de los 5 casos (40%) con DTF de alto grado, observamos positividad para *PD-L1* en la mayor parte de las células en DTF en el frente invasor, mientras que las células en el centro de la lesión resultaron negativas. (Figura A2) En estos casos, el infiltrado inflamatorio peritumoral mostró positividad débil y variable, aunque en menor proporción en relación con los casos con DTF de bajo grado.

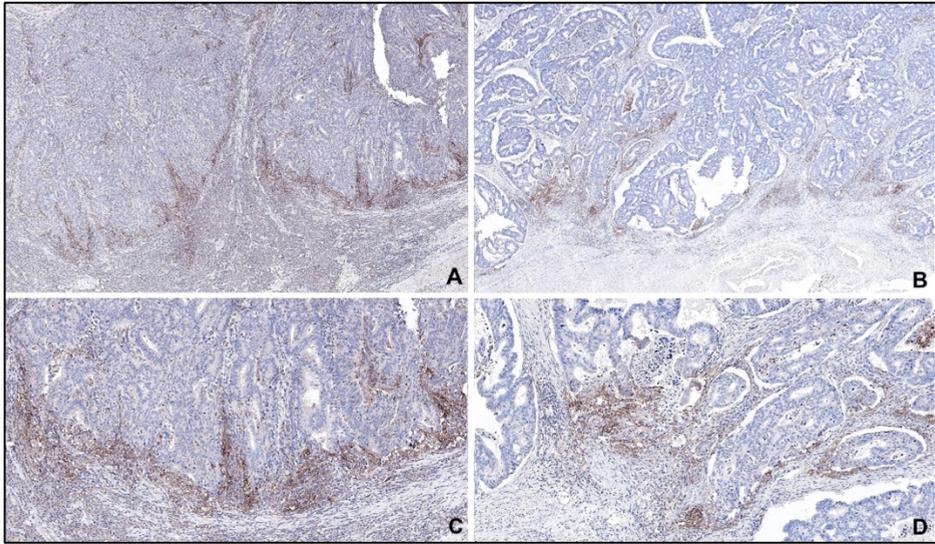


Figura A1: Expresión inmunohistoquímica de *PD-L1* en los casos con DTF de bajo grado. A y B: inmunotinción positiva en las células inflamatorias peritumorales. Las células neoplásicas tanto en el frente invasor como en el centro del tumor resultaron negativas. C y D: inmunotinción positiva en los macrófagos peritumorales del frente invasor. (A y C: caso 35, 10X y 20X; B y D: caso 63, 10X y 20X).

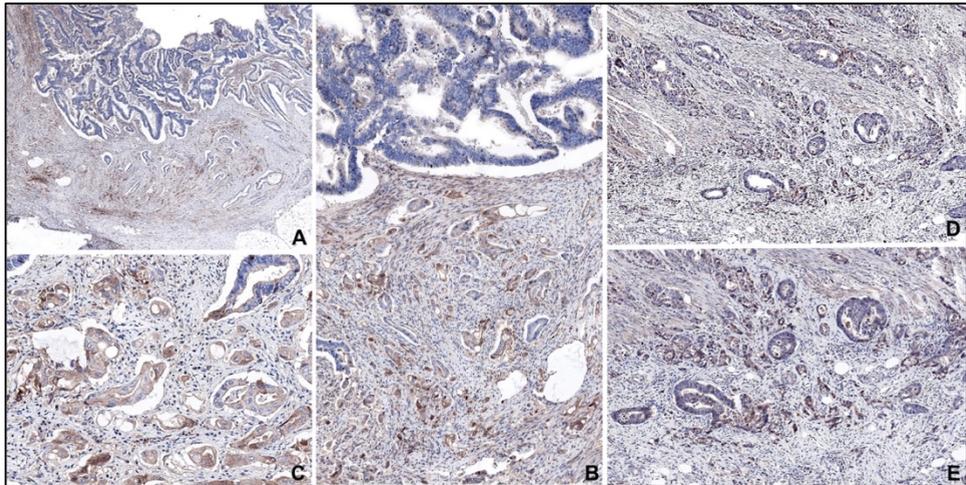


Figura A2: Expresión inmunohistoquímica de *PD-L1* en los casos con DTF de alto grado. A, B y D: expresión inmunohistoquímica positiva en la mayor parte de las células sueltas y los grupos celulares en DTF en el frente invasor. Las células tumorales en el centro de la lesión resultaron negativas. C y E: inmunotinción positiva moderada a intensa en las células en DTF del frente invasor. (A, B y C: caso 122, 4X, 20X y 40X; D y E: caso 97, 20X y 40X).

## Anexo 2. Publicación de artículo científico generada a partir de los resultados de este estudio.

Modern Pathology  
https://doi.org/10.1038/s41379-018-0124-5



ARTICLE



### Low miR200c expression in tumor budding of invasive front predicts worse survival in patients with localized colon cancer and is related to PD-L1 overexpression

Carolina Martínez-Ciarpaglini<sup>1</sup> · Sara Oltra<sup>2</sup> · Susana Roselló<sup>2</sup> · Desamparados Roda<sup>2</sup> · Cristina Mongort<sup>2</sup> · Francisca Carrasco<sup>2</sup> · José Gonzalez<sup>1</sup> · Francisco Santonja<sup>3</sup> · Noelia Tarazona<sup>2</sup> · Marisol Huerta<sup>1</sup> · Alejandro Espi<sup>4</sup> · Gloria Ribas<sup>2</sup> · Antonio Ferrández<sup>1</sup> · Samuel Navarro<sup>5</sup> · Andrés Cervantes<sup>2</sup>

Received: 2 June 2018 / Revised: 22 July 2018 / Accepted: 23 July 2018  
© United States & Canadian Academy of Pathology 2018

#### Abstract

At the histological level, tumor budding in colon cancer is the result of cells undergoing at least partial epithelial-to-mesenchymal transition. The microRNA 200 family is an important epigenetic driver of this process, mainly by downregulating zinc-finger E-box binding homeobox (ZEB) and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) expression. We retrospectively explored the expression of the miR200 family, and ZEB1 and ZEB2, and their relationship with immune resistance mediated through PD-L1 overexpression. For this purpose, we analyzed a series of 125 colon cancer cases and took samples from two different tumor sites: the area of tumor budding at the invasive front and from the tumor center. We found significant ZEB overexpression and a reduction in miR200 in budding areas, a profile compatible with epithelial-to-mesenchymal transition. In multivariate analysis of the cases with localized disease, low miR200c expression in budding areas, but not at the tumor center, was an adverse tumor-specific survival factor (hazard ratio: 0.12; 95% confidence interval: 0.03–0.81;  $p = 0.02$ ) independent of the clinical stage of the disease. PD-L1 was significantly overexpressed in the budding areas and its levels correlated with a mesenchymal transition profile. These results highlight the importance of including budding areas among the samples used for biomarker evaluation and provides relevant data on the influence of mesenchymal transition in the immune resistance mediated by PD-L1 overexpression.

#### Introduction

Tumor budding is defined as the presence of isolated cells or clusters of up to 5 cells at the invasive front of colon cancer tumors. It is a well-recognized independent predictor of lymph node metastasis in pT1 colorectal tumors and an independent predictor of survival in stage II patients [1–4]. Epithelial-to-mesenchymal transition has been postulated to be responsible for tumor bud formation [5–8]. In the consensus molecular classification of colon cancer, the mesenchymal subgroup (CMS4) is the most aggressive subtype, and displays upregulation of genes implicated in epithelial-to-mesenchymal transition and signatures associated with the activation of transforming growth factor receptor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [9].

MicroRNAs (miRNAs) are small, noncoding RNAs with important functions in development, and cell differentiation and proliferation [10]. Each miRNA targets multiple genes to negatively regulate their expression either through messenger RNA (mRNA) degradation or translation inhibition

These authors jointly supervised this work: Samuel Navarro, Andrés Cervantes

✉ Carolina Martínez-Ciarpaglini  
carolmartinez@incliva.es

- <sup>1</sup> Department of Pathology, Biomedical Research Institute INCLIVA, Valencia, Spain
- <sup>2</sup> Department of Medical Oncology, Biomedical Research Institute INCLIVA, CiberOnc, University of Valencia, Valencia, Spain
- <sup>3</sup> Department of Statistics and Operations Research, University of Valencia, Valencia, Spain
- <sup>4</sup> Department of Surgery, Biomedical Research Institute INCLIVA, University of Valencia, Valencia, Spain
- <sup>5</sup> Department of Pathology, Biomedical Research Institute INCLIVA, CiberOnc, University of Valencia, Valencia, Spain

Published online: 11 September 2018

SPRINGER NATURE

[10, 11]. The miR200 family comprises 5 members, located in two different clusters: cluster I in chromosome 1 containing miR200a, miR200b, and miR429, and cluster II in chromosome 12 containing miR200c and miR141 [12]. This family is known to be an epigenetic regulator of epithelial-to-mesenchymal transition, and is able to control the process through a feedback loop with the promoter regions of zinc-finger E-box binding homeobox (ZEB) and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) [13–15]. ZEB1 and ZEB2 are large transcription factors containing two zinc-finger domains and are important regulators of cadherin expression and epithelial-to-mesenchymal transition in colon cancer [16–20]. miR200 expression may be mediated by transcription factors such as ZEB or by epigenetic mechanisms. Moreover, methylation of the two miR200 promoter regions could be used to identify mesenchymal tumor subtypes, and has already been shown to be predictive of shorter disease-free survival rates in colon cancer patients [21].

In this work, we explored the expression of genes and miRNAs implicated in epithelial-to-mesenchymal transition: ZEB1, ZEB2, miR200a, miR200b, and miR200c, both in the center of tumors and at the invasive tumor front with the highest concentration of tumor buds. We related the expression of each molecule according to the sampled area, to patient survival rates, in a series of 125 colon cancer cases. Finally, we also evaluated the expression of PD-L1 in both areas to gain a better understanding of the mechanisms of immune resistance associated with tumor budding and epithelial-to-mesenchymal transition.

## Materials and methods

We retrospectively analyzed 125 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) colectomy specimens from colon cancer patients which had been received consecutively at the Department of Pathology in the Hospital Clínico Universitario de Valencia (Spain), over 15 months, from January 2012 to April 2013. Samples from tumors located below the peritoneal reflection were excluded.

## Pathological evaluation

All the slides were reviewed by 2 pathologists (C.M. and S.N.F) and were classified according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th edition guidelines [22]. The tumor differentiation (high or low), invasion pattern (infiltrative vs. expansive), and the presence of lymphovascular or perineural invasion were recorded in each case. Clinical and follow-up information was obtained from the medical history records of all the

participants. The study protocol was approved by the Ethics Board at the INCLIVA Biomedical Research Institute. Tumor budding was assessed in a hotspot area of 0.785 mm<sup>2</sup> on H&E sections, which was chosen after reviewing all the available slides containing invasive tumor sections and according to the recommendations of the international tumor budding consensus conference [7]. Each case was classified in one category: low, intermediate or high-grade tumor budding when having 0–4, 5–9, and 10 or more buds.

## Immunohistochemical studies

Paraffin-embedded tumor sections were deparaffinized and the antigens were retrieved in a high pH citrate buffer in a pressure cooker (Dako). The immunohistochemical studies were done using an automated Autostainer Link 48 system (Dako, Glostrup, Denmark) with the following monoclonal antibodies: MLH1 (clone IR079, dilution 1:100, Dako), MSH2 (clone IR085, dilution 1:100, Dako), MSH6 (clone IR086, dilution 1:100, Dako), and PMS2 (clone IR087, dilution 1:100, Dako). PD-L1 immunostaining was carried out in a low pH citrate buffer (clone 28.8, prediluted, Dako). Only the complete loss of nuclear staining in combination with a positive internal control was accepted as the loss of mismatch repair (MMR) protein expression. Lymphocytes, stromal cells, and non-neoplastic epithelial cells were used as internal controls.

## RNA isolation and molecular studies

RNA was purified from samples selected from two different tumor areas: from the center and at the invasion front, the latter including the tissue with the highest concentration of buds. Samples were deparaffinized using a deparaffinization solution (Qiagen, CA). Total RNA (including small RNAs) was purified using the AllPrep DNA/RNA FFPE kit (Qiagen, CA) following the manufacturer's instructions. The RNA concentration was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop). Reverse transcription (RT) was carried out using the TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit in presence of RNase inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA). The RT reaction was multiplexed by creating a customized RT primer pool using the following primers: UAACACUGUCUGGUAACGAUGU for hsa-miR-200a-3p (MIMAT0000682), UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA for hsa-miR-200b-3p (MIMAT0000318), and UAAUACUGCCGGGUAUGAUGGA for hsa-miR-200c (MIMAT0000617). A pre-amplification step for the RT-PCR studies was required using the following primers: UAACACUGUCUGGUAACGAUGU for ZEB1, UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA for ZEB2, and UA

**Table 1** Clinicopathological features

Age (years)		
Median (range)	71.78	(36–92)
Gender, <i>n</i> (%)		
Female	53	(42.4%)
Male	72	(57.6%)
Tumor location, <i>n</i> (%)		
Ascending colon	51	(40.8%)
Transverse colon	6	(4.8%)
Descending colon	68	(54.4%)
Histological grade, <i>n</i> (%)		
Low	98	(78.4%)
High	27	(21.6%)
pTNM stage, <i>n</i> (%)		
I	18	(14.4%)
II	46	(36.8%)
III	44	(35.2%)
IV	17	(13.6%)
pT, <i>n</i> (%)		
T1	5	(4.0%)
T2	20	(16.0%)
T3	59	(47.2%)
T4	41	(32.8%)
pN, <i>n</i> (%)		
N0	70	(56.0%)
N1	36	(28.8%)
N2	19	(15.2%)
M, <i>n</i> (%)		
M0	113	(90.4%)
M1	17	(13.6%)
Lymphovascular invasion, <i>n</i> (%)		
Absent	83	(66.4%)
Present	42	(33.6%)
Perineural invasion, <i>n</i> (%)		
Absent	96	(76.8%)
Present	29	(23.2%)
Mismatch repair status		
Deficient	4	(3.2%)
Proficient	121	(96.8%)

AUACUGCCGGGUAUAUGAUGGA for PD-L1. The expression of genes and miRNAs were analyzed by quantitative real time-PCR (qRT-PCR) using TaqMan Gene Expression Assays for genes and TaqMan microRNA Assays for miRNAs (Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad, California, USA). The samples were normalized to GAPDH and RNU6B for genes and miRNAs, respectively, and relative expression was calculated by using the comparative Ct method to obtain the fold-change value ( $\Delta\Delta C_t$ ) [23].

## Statistical analysis

The data were statistically analyzed using the software R, version 3.4.2 (Vienna, Austria); *p*-values of 0.05 or less were set as the threshold for statistical significance. The clinical and pathological characteristics of the patients were compared using the Chi-squared test or the Wilcoxon test for qualitative and quantitative variables, respectively; prior to this, the data were assessed for normality using the Shapiro–Wilk test. Tumor-specific survival was calculated from the time of colectomy to death from tumor-related causes or until the last known follow-up. Disease-free survival was defined as the period from the time of colectomy until metastasis or death. Survival was analyzed by comparing Kaplan–Meier curves using the log-rank test. Tumor-specific survival and disease-free survival were evaluated in non-metastatic (stages I to III) disease. Multivariate regression analysis was carried out using Cox proportional hazards models with stepwise selection, including any variables which significantly correlated with the survival probability in the univariate analysis.

## Results

### Clinicopathological features and tumor budding

The clinicopathological features of the data are summarized in Table 1; 30% of cases (*n* = 36) showed high-grade tumor budding, 32% (*n* = 39) intermediate-grade, and 38% (*n* = 47) low-grade. As shown in Table 2, we observed a significant association between high tumor budding grades and adverse prognostic factors in colon cancer: more advanced clinical stage (*p* = 0.03), higher tumor grade (*p* = 0.01), larger tumor size, or pT (*p* = 0.00), a higher number of positive lymph nodes, or pN (*p* = 0.00), and the presence of lymphovascular (*p* = 0.00) and perineural invasion (*p* = 0.00). Only 4 cases (3.2%) showed loss of MMR protein expression, and we found no relationship between MMR deficiency and tumor budding grade.

### Expression analysis

The expression of miR200a, miR200b, and miR200c was significantly lower at the invasive front compared with the tumor center (*p* = 0.00 in all cases). Conversely, ZEB1 and ZEB2 were overexpressed at the invasive front (*p* = 0.00 and 0.02, respectively), especially in cases with an infiltrative growth pattern (*p* = 0.00). PD-L1 was also overexpressed at the invasive front with respect to the tumor center (*p* = 0.01), especially in cases with high-grade tumor budding compared to cases with low and intermediate-grade (*p* = 0.03). PD-L1 overexpression at the invasive front was

**Table 2** Clinicopathological characteristics according to tumor budding grade

	Low <i>n</i> = 36 (29.5%)	Intermediate <i>n</i> = 39 (32.0%)	High <i>n</i> = 47 (38.5%)	<i>P</i> -value
<b>Histological grade, <i>n</i> (%)</b>				
Low	33 (91.67)	33 (84.62)	32 (68.09)	0.01
High	3 (8.33)	6 (15.38)	15 (31.91)	
<b>pTNM stage, <i>n</i> (%)</b>				
I	10 (27.78)	4 (10.26)	3 (6.38)	0.03
II	15 (41.67)	16 (41.03)	14 (29.79)	
III	9 (25.00)	13 (33.33)	21 (44.78)	
IV	2 (5.56)	6 (15.38)	9 (19.15)	
<b>pT, <i>n</i> (%)</b>				
T1	5 (13.89)	0 (0.00)	0 (0.00)	0.00
T2	10 (27.78)	5 (12.82)	4 (8.51)	
T3	20 (55.56)	21 (53.85)	17 (36.17)	
T4	1 (2.78)	13 (33.33)	26 (55.32)	
<b>pN, <i>n</i> (%)</b>				
N0	28 (77.78)	22 (56.41)	19 (40.43)	0.00
N1	8 (22.22)	7 (17.95)	20 (42.55)	
N2	0 (0.00)	10 (25.64)	8 (17.02)	
<b>Lymphovascular invasion, <i>n</i> (%)</b>				
No	33 (91.67)	23 (58.93)	24 (51.06)	0.00
Yes	3 (8.33)	16 (41.03)	23 (48.94)	
<b>Perineural invasion, <i>n</i> (%)</b>				
No	35 (97.22)	37 (94.87)	31 (65.96)	0.00
Yes	1 (2.78)	2 (5.13)	16 (34.04)	
<b>Mismatch repair protein expression, <i>N</i> (%)</b>				
Proficient	34 (97.14)	36 (94.74)	46 (97.87)	0.71
Deficient	1 (2.86)	2 (5.26)	1 (2.13)	

correlated with lower levels of miR200a ( $p = 0.02$ ) and miR200c ( $p = 0.03$ ) expression, and higher levels of ZEB1 ( $p = 0.00$ ) and ZEB2 ( $p = 0.00$ ) expression (Fig. 1). However, we found no correlation between miR200a, miR200b, miR200c, ZEB1, or ZEB2 expression and tumor budding grade. Relative to the tumor centers, there was a significant decrease in miR200a, miR200b, and miR200c expression and increased ZEB1 and ZEB2 expression at the invasive fronts with the most tumor budding, but these differences were not significantly correlated to the tumor budding grade.

#### Immunohistochemical study of PD-L1

All the cases (5 of 5) with low-grade tumor budding showed positive PD-L1 immunoreactivity restricted to peritumoral inflammatory cells in the invasive front, while the tumor cells were completely negative. However, 2 of 5 (40%) high-grade tumor budding cases presented positive

immunostaining limited to the tumor buds at the invasive front, while the main tumor bulk was negative (Fig. 2).

#### Survival analysis

The median follow-up time was 43 months and 50% of all cases were followed for at least 50 months.

#### Tumor-specific survival in stages I, II, and III disease

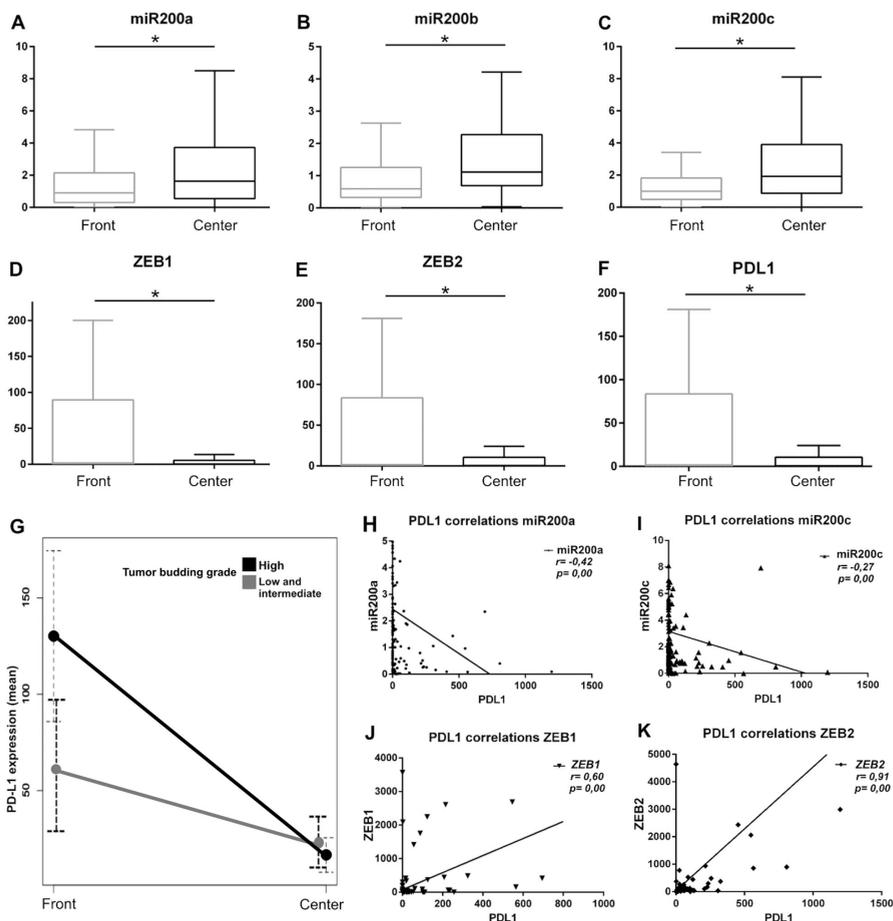
As shown in Fig. 3, the univariate analysis of cases in stages I to III showed that lower tumor-specific survival was significantly correlated with low (below the median) miR200c ( $p = 0.03$ ) and miR200a ( $p = 0.04$ ) expression at the invasive front. The clinical stage ( $p = 0.00$ ) and the presence of lymphovascular invasion ( $p = 0.01$ ) significantly correlated with tumor-specific survival. Multivariate analysis of stage I to III patients, showed that miR200c expression at the invasive front, followed only by the clinical stage, was an independent predictor of tumor-specific survival (Table 3).

#### Disease-free survival in stage II and tumor-specific survival in stage III disease

We observed a significant association between the disease-free survival rate and miR200c expression at the invasive front in stage-II cases ( $p = 0.03$ ). We did not perform multivariate analysis because the only variable significantly associated with disease-free survival found in the univariate analysis was miR200c expression. In stage-III cases, miR200c and miR200a expression significantly influenced tumor-specific survival ( $p = 0.01$  and  $p = 0.05$ , respectively). In all cases, miR200 expression and survival only correlated when they were measured at the tumor front, and no other factors influenced the survival probability in stage-III disease. Multivariate analysis of cases in stage III revealed miR200c expression at the invasive front as the only independent predictor of tumor-specific survival (Table 3).

#### Discussion

According to our results, the colon cancer invasive front with the most tumor budding has an expression profile consistent with epithelial-to-mesenchymal transition: decreased miR200a, miR200b, and miR200c expression and increased ZEB1 and ZEB2 expression. Moreover, reduced miR200a and miR200c expression was associated with a significant decrease in the probability of tumor-specific survival, but only when these biomarkers were evaluated in the tumor fronts with the most budding activity and not in the tumor centers. This highlights the problem of intra-tumor heterogeneity and the importance of sample

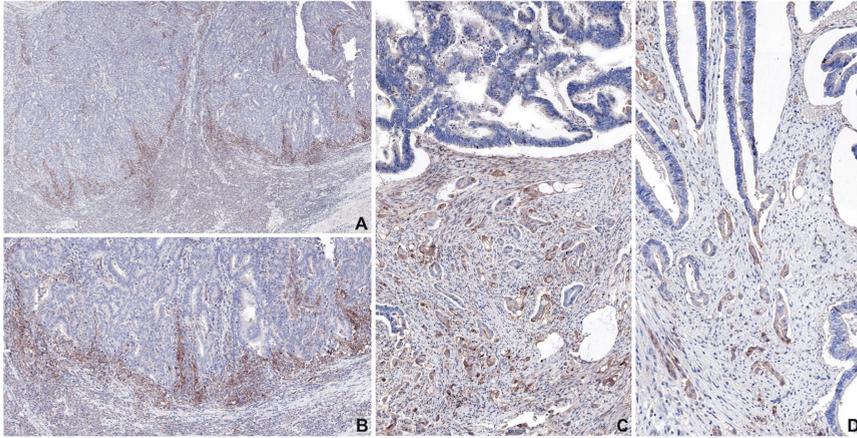


**Fig. 1** miR200, ZEB1, ZEB2, and PD-L1 expression in both the tumor center and at the invasive front. **a–c** miR200a, miR200b, and miR200c expression was lower in the invasive front compared with the tumor center ( $p = 0.00$  in all cases, \*Statistically significant). **d–f** ZEB1, ZEB2 and PD-L1 were overexpressed at the invasive front with respect to the center ( $p = 0.00$ ,  $p = 0.02$ , and  $p = 0.00$ , respectively,

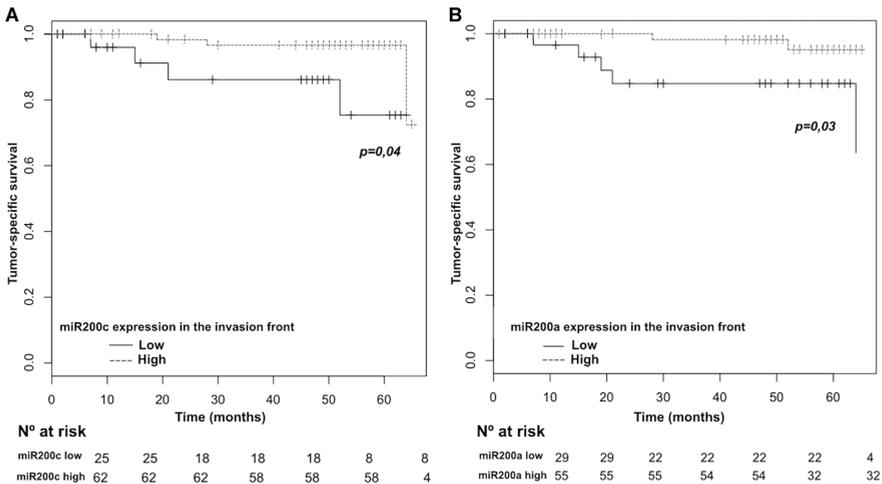
\*Statistically significant), **g** Cases with high-grade tumor budding reached higher PD-L1 expression levels at the invasive front compared with cases with low and intermediate-grade tumor budding ( $p = 0.03$ ). **h–i** miR200a and miR200c expression were inversely correlated with PD-L1 expression. **j, k** ZEB1 and ZEB2 expression directly correlated with PD-L1 expression

selection for molecular studies, especially in the identification of the CMS4 colon cancer molecular subtype, which has the worse prognosis [24]. These findings might be explained by the enrichment of cancer-associated fibroblasts at the invasive front because these act as TGF- $\beta$  pathway activators, which influence neoplastic transformation, and probably induce tumor budding during epithelial-to-mesenchymal transition processes [8, 25, 26].

Immunohistochemical expression of PD-L1 has previously been used as a biomarker to identify subsets of patients with solid tumors who are more likely to respond to immune-checkpoint blockade inhibitors [27, 28]. In colon cancer, the only confirmed predictor of such a response is a MMR deficiency status which results in a log-fold increase in the tumor mutational burden [29–33]. PD-L1 expression in colon cancer is more frequent in cases with deficient



**Fig. 2** Immunohistochemical study of PD-L1. **a, b** low-grade tumor budding case with positive immunostaining restricted to peritumoral inflammatory cells at the invasive front; the tumor cells were completely negative (**a**: 10x and **b**: 20x magnification). **c, d** High-grade tumor budding case with positive immunostaining limited to the tumor buds at the invasive front; the tumor bulk was negative (**c**: 20x and **d**: 40x magnification)



**Fig. 3** Tumor-specific survival for patients in stage I to III, according to miR200c (**a**) and miR200a (**b**) expression

MMR and has been associated with features of the serrated pathway such as BRAF mutations and a medullary morphology [34]. In microsatellite-stable colon cancer, the expression of PD-L1 is less frequent and varies between 3 and 40% according to the series [34, 35]. In our cases, PD-L1 was overexpressed at the tumor invasive front relative to

the center, and this increase was significantly higher in tumors with high-grade tumor budding.

The immunohistochemical staining pattern of PDL1, and the absence of expression in the tumor bulk compared to the invasive edge, better illustrates these molecular findings. Interestingly, 40% of cases (2 of 5) with high-grade tumor

**Table 3** Multivariate analysis for tumor-specific survival

Stage I, II, and III disease	HR	95% CI	<i>p</i> -value
<i>miR200c</i> expression in the tumor budding areas (high)	0.12	0.03–0.81	0.02
<i>Clinical stage (I–II)</i>	0.17	0.03–1.93	0.04
<i>miR200a</i> expression in the tumor budding areas (high)	0.21	0.04–1.12	0.06
Lymphovascular invasion (present)	2.27	0.59–8.69	0.23
<i>Stage-III disease</i>			
<i>miR200c</i> expression in the tumor budding areas (high)	0.12	0.01–0.80	0.02
<i>miR200a</i> expression in the tumor budding areas (high)	0.20	0.04–1.84	0.06

HR hazard ratio, CI confidence interval

budding displayed positive bud immunostaining while in low-grade tumor budding cases, tumor cells were completely negative and only peritumoral inflammatory cells were positive. Moreover, we observed a significant correlation between PD-L1 overexpression and an expression profile consistent with epithelial-to-mesenchymal transition: increased ZEB1 and ZEB2 and decreased miR200a and miR200c expression. These findings suggest that PD-L1 overexpression may be related to tumor cell evasion of the immune response during epithelial-to-mesenchymal transition. Expression of the immune checkpoint ligand PD-L1 has been demonstrated to activate the epithelial-to-mesenchymal transition program in model breast carcinoma tumor cells [36, 37]. In colon cancer, PD-L1 expression in tumor buds has been studied in a few cases, with similar results [38].

The main limitations of our study are its retrospective and exploratory design, which aimed to generate hypotheses, rather than confirm them. Based on these results, the invasive front of colon cancer seems to significantly contribute to the molecular tumor phenotype probably because of the presence of tumor buds in this area. Therefore, sample area selection is important to properly reflect intra-tumor heterogeneity, and the inclusion of the invasive edge in samples for molecular phenotyping and detection of biomarkers appears to be crucial. Both a decrease in miR200c expression and higher concentrations of tumor buds at the invasive front of colon cancer are negative survival factors in stage I to III patients and are predictors of relapse in stage II patients. Thus, inclusion of the invasive front and the tumor budding areas in the samples used for molecular studies (especially in the identification of the CMS4 molecular subtype) is imperative for two reasons: first, the expression profile of these areas, rather than in the tumor center, is consistent with epithelial-to-mesenchymal transition, and second, the expression of miR200 at the

invasive front, but not in the tumor center, significantly influences the patient survival probability. Finally, PD-L1 is overexpressed in the tumor areas with an epithelial-to-mesenchymal transition expression profile: the invasive front and tumor budding cells.

**Acknowledgements** Sara S. Oltra is funded by a FPU pre-doctoral fellowship (FPU13/04976) from MINECO (Spanish Government). Gloria Ribas is funded on a Miguel Servet II contract (CPIII4-00013), Desamparados Roda is a recipient of the Joan Rodés Grant (Contract 16/00040), and Noelia Tarazona is a recipient of the Rio Hortega Grant (Contract 15/00246), all from the Instituto de Salud Carlos III. This work was supported by grant PI15/02180 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Instituto de Salud Carlos III) from the Spanish Government and CIBERONC, awarded to Andrés Cervantes. Francisca Carrasco has a contract as a laboratory technician from CIBERONC. This study was partially supported by a grant from the Carlos III Health Institute (PI16/00395) awarded to Gloria Ribas, and FEDER funds.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

- Bosch S, Teerenstra S, De Wilt J, Cunningham C, Nagtegaal I. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy*. 2013;45:827–34.
- Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K et al. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127:385–94.
- Graham R, Vierkant R, Tillmans L, Wang A, Laird P, Weisenberger D et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: confirmation of prognostic significance and histologic cutoff in a population-based cohort. *Am J Surg Pathol*. 2015;39:1340–6.
- Koelzer V, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer - Ready for diagnostic practice? *Hum Pathol*. 2016;47:4–19.
- Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as onco-target. *Oncotarget*. 2010;1:651–61.
- Dan Grigore A, Kumar J, Jia D, Farach-Carson M, Levine H. Tumor Budding: the Name is EMT. *Part I EMT*. *J Clin Med* 2016; 29:51 <https://doi.org/10.3390/jcm5050051>
- Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*. 2017;30:1–13. (2017)
- De Smedt L, Palmans S, Andel D, Govaere O, Boeckx B, Smeets D et al. Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. *Br J Cancer*. 2017;116:58–65.
- Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Songson C et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21:1350–6.
- Garzon R, Calin G, Croce C. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*. 2009;60:167–79.
- Macfarlane L, Murphy P. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genom*. 2010;11:537–61.

12. Humphries B, Yang C. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget*. 2015;6:6472–98.
13. Topalian S, Taube J, Anders R, Pardoll D. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:275–87.
14. De Sousa E, Melo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij L et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med*. 2013;19:614–8.
15. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med*. 2013;10:e1001453. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001453>.
16. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res*. 2005;24:6566–78.
17. Das S, Becker B, Hoffmann F, Mertz JE. Complete reversal of epithelial to mesenchymal transition requires inhibition of both ZEB expression and the Rho pathway. *BMC Cell Biol*. 2009;10:94. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-94>.
18. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007;7:415–28.
19. Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: At the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer*. 2012;132:745–54.
20. Trinh A, Trumpi K, De Sousa E, Melo F, Wang X, de Jong J, Fessler E et al. Practical and robust identification of molecular subtypes in colorectal cancer by immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*. 2017;23:387–98.
21. Fessler E, Jansen M, De Sousa E, Melo F, Zhao L, Prasetyanti P, Rodermond H et al. A multidimensional network approach reveals microRNAs as determinants of the mesenchymal colorectal cancer subtype. *Oncogene*. 2016;35:6026–37.
22. Amin M, Edge S, Greene F, Byrd D, Brookland R, Washington M et al. *AJCC cancer staging manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017.
23. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 delta delta C T method. *Methods*. 2001;25:402–8.
24. Ubink I, Elias S, Moelans C, Laclé M, Van Grevenstein W, Van Diest P et al. A novel diagnostic tool for selecting patients with mesenchymal-type colon cancer reveals intratumor subtype heterogeneity. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109:djw303. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw303>.
25. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llergo A, Espinet E, Herando-Momblona X, Iglesias M et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2015;47:320–9.
26. Isella C, Terrasi A, Bellomo S, Petti C, Galatola G, Muratore A et al. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nat Genet*. 2015;47:312–9.
27. Chen J, Jiang C, Jin L, Zhang X. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol*. 2016;27:409–16.
28. Valentini A, Di Pinto F, Cariola F, Guerra V, Giannelli G, Caruso M et al. PD-L1 expression in colorectal cancer defines three subsets of tumor immune microenvironments. *Oncotarget*. 2018;9:8584–96.
29. Amin M, Lockhart A. The potential role of immunotherapy to treat colorectal cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24:329–44.
30. Xiao Y, Freeman G. The microsatellite instable subset of colorectal cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Discov*. 2015;5:16–8.
31. Sanchez-Castañón M, Er T, Bujanda L, Herreros-Villanueva M. Immunotherapy in colorectal cancer: what have we learned so far? *Clin Chim Acta*. 2016;460:78–87.
32. Diaz L, Le D. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372:2509–20.
33. Kim J, Park H, Cho N, Lee H, Kang G. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2016;115:490–6.
34. Rosenbaum M, Bledsoe J, Morales-Oyarvide V, Huynh T, Mino-Kenudson M. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol*. 2016;29:1104–12.
35. Droezer R, Hirt C, Viehl C, Frey D, Nebiker C, Huber X et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2013;49:2233–42.
36. Alsuliman A, Colak D, Al-Harazi O, Fitwi H, Tulbah A, Al-Tweigeri T et al. Bidirectional crosstalk between PD-L1 expression and epithelial to mesenchymal transition: significance in claudin-low breast cancer cells. *Mol Cancer* 2015;14:149. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0421-2>.
37. Noman M, Janji B, Abdou A, Hasim M, Terry S, Tan T et al. The immune checkpoint ligand PD-L1 is upregulated in EMT-activated human breast cancer cells by a mechanism involving ZEB-1 and miR-200. *Oncimmunology* 2017;6:e1263412. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1263412>.
38. Prall F, Hühns M. PD-L1 expression in tumour buds of colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2016;69:158–60.